Ｖ．分析マニュアル

簡易コアサンプラーによる

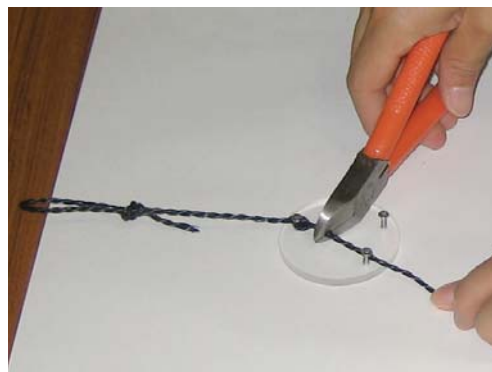
不撹乱堆積物試料の採取マニュアル

堆積物の不撹乱層別採取は養殖漁場の環境評価に不可欠である。従来より，層別堆積物試料の採取にはKK式などのコアサンプラー（コアラー，柱状採泥器）が用いられてきたが，装置が海底面に着地した際に水・堆積物境界層を乱したり，船上に引き上げる際に内容物がこぼれ落ちることがあり，試料採取に多大な労力を要した。市販のエクマン･バージ型採泥器の中にコアをセットすることにより，不撹乱堆積物試料を安価に簡易に採取することが可能となったので本手法を紹介する。

コアサンプラー（IE式：Inside Ekman-grab）の作り方

1．外径50 mm，内径44 mm（外径，内径は適宜，変更可能）のアクリルパイプを長さ23 cmに切断し（これをコアとよぶ），片方の外側を斜めに削り，もう一方の切断面をサンドペーパーにより平らにする。

2．コアの上部3箇所に小型のステンレス製ネジを取り付ける。

3．厚さ4 mm前後，直径50 mm（コアの外径にあわせる）のアクリル円盤にネジを取り付ける。1つのネジに紐を取り付けその先端に輪を作る。

4．コアの2つのネジとアクリル円盤の2つのネジを，コアの1つのネジと円盤の1つのネジを，それぞれ輪ゴムで連結する。

5．エクマン･バージ型採泥器（離合社，底面の1辺20 cm）のアームをとりつけている4つのネジのうち1個をはずし，市販の両開クランプ（例：アズワンカタログの品番

6-775-03）を採泥器内部にとりつけ，はずしたネジで固定する。

6．円盤をつけたコアをクランプで採泥器内部に固定し，円盤につけた紐先端の輪を採泥器のフックにかけて円盤が適度に開くように紐の長さを調整する。

7．コアの内径より若干短い径を有するゴム栓を作る。

8．外径 2～3 cm，長さ約 40 cm の塩ビ管（押し出し棒）に 1 cm 刻みの目盛りをつける。

堆積物試料の採取法

1．コアをセットした採泥器をゆっくりと海底に着地させ，メッセンジャーにより採泥器の底蓋とコア上部の円盤を閉じさせる。

2．採泥器を船上に引き上げ，コア下部にゴム栓をさしこむ。

3．クランプを緩めてコアをとり出し，押し出し棒でゴム栓を押しあげ堆積物を層別に採取する。堆積物の表層に水分が非常に多量に含まれる場合，堆積物表面をスポイトで吸い取る。

IE 式コアサンプラーの長所

1．不撹乱堆積物の採取が可能：採泥器をゆっくりと海底に降ろしても自重により堆積物に垂直に貫入するため，着底時に堆積物表面を乱さず，底面に鉛直なコアサンプルを採取できる。アクリル円盤によりコア内が密閉されるので，堆積物と直上水を撹乱させることなく船上に引き上げることができる。

2．砂質堆積物でも採取可能：これまでの簡易型コアサンプラーにはコアの下端を閉じる装置がなく，海底から引き上げる途中で砂質堆積物がこぼれ落ちることが多かった。IE 式コアサンプラーで採取できる堆積物の深さは泥質で 10 cm 前後，砂質ではせいぜい 4 cm 前後で，砂底では堆積物の深さが十分ではないが，エクマン･バージ採泥器で採取可能な底質であれば砂底でも試料の採取が可能である。

3．コアの交換が可能：調査海域の底質や採取したい試料の量により径の異なるコアを選択できる。径が 5 cm 程度のコアであればエクマン･バージ採泥器（20 cm×20 cm）内に同時に 2 本のコアを設置できる。

4．堆積物直上水の採取が可能

5．取り扱いが容易

6．安価で手作り可能

Ver. 1.0　（2010 年 1 月 29 日）

養殖漁場底泥からの DNA 抽出マニュアル

目次

１．適用範囲

環境中から直接 DNA を抽出して、PCR や DGGE などの分子生物学的手法を用いることによって環境中の微生物群集を明らかにする方法が主流となっている。この手法で最も重要な要素の一つとして純度の高い DNA を効率よく抽出することが必要である。本マニュアルでは、養殖漁場などの海底泥を対象とする簡便で高純度・高収率の DNA 抽出方法について述べる。

２．一般事項

本手法はビーズを用いて物理的に微生物細胞を破砕する方法なので、得られる DNA の性質を十分理解しておくこと。本手法は市販のキットを用い、プロトコール通りに操作するので、キットに付属するプロトコールを熟読すること。

３．方法の原理

セラミックとシリカのビーズで底泥中の微生物細胞をバッファー中で破砕し、得られた DNA をシリカマトリックスに吸着させて不純物を除去した後、最終的にマトリックスに吸着した DNA を溶出させて純度の高い DNA を回収する。

４．抽出方法

４．１　方法の要旨

一定量の底泥をビーズの入ったチューブに計りとり、ビーズビート法で細胞を破砕した後、DNA をシリカマトリックスに吸着させる。このマトリックスを洗浄した後、最終的に DNA を溶出させる。

４．２　購入試薬、キット

- ✓ FastDNA® SPIN Kit for Soil（MP Miomedicals, LLC）
- ✓ 特級エタノール

４．３　調整試薬

- ✓ FastDNA® SPIN Kit for Soil に付属する SEWS-M に 100 ml のエタノールを加える。

４．４　機器、器具

- ✓ 電子上皿天秤
- ✓ FastPrep® 24 Instrument
- ✓ 遠心分離機（1.5～2.0 ml 容エッペンチューブ用ローター付、最低 14,000×*g* が必要）
- ✓ ローテーター

４．５　実験操作

４．５．１　操作準備作業

実験室を清潔に保つこと。白衣、マスク、プラスチックグローブを着用する。

４．５．２　実験場所

分子生物学実験を行う通常の実験室

４．５．３　試薬および器具

- ✓ 軽量エッペンチューブ立て（発泡スチロール板やエッペンチューブのフローターを切り取るなど自作する）
- ✓ 薬さじ（260℃で 2 時間処理する）
- ✓ 100 ml 容メスシリンダー
- ✓ 各種ディスペンサー（20～200 µl 容、200～1000 µl 容）
- ✓ 各種ディスペンサー用ピペットチップ
- ✓ 1.5 ml 容エッペンチューブ
- ✓ 2 ml 容エッペンチューブ
- ✓ エッペンチューブ用スタンド
- ✓ プラスチックバイアル（4.0 ml 容、Iwaki Glass 製）
- ✓ プラスチックバイアル用スタンド
- ✓ タイマー
- ✓ プラスチックグローブ
- ✓ マスク

４．５．４　泥の秤量

Lysing Matrix E Tube（FastDNA® SPIN Kit for Soil 付属）を軽量エッペンチューブ立てに立て、電子上皿天秤に載せる。風袋を 0 にあわせる。薬さじを用いて 0.5 g の泥を測りとり、Lysing Matrix E Tube に入れる。直ちに DNA 抽出操作を行わない場合は、-85℃で保存する。

４．５．５　DNA 抽出操作

1. 泥の入った Lysing Matrix E Tube に 978 µl の Sodium Phosphate Buffer と 122 µl の MT Buffer を添加する。泥の水分含量が多い場合、蓋を閉めるときに試薬がこぼれ出る場合がある。このような場合は、Sodium Phosphate Buffe を添加した後に Vortex Mixer などで一度良く混合してから、MT Buffer を添加するとよい。
2. FastPrep® 24 Instrument に Lysing Matrix E Tube をセットし、5.5 のスピードで 30

秒間処理する。

3. Lysing Matrix E Tube を 14,000×g で 30 秒間、遠心分離を行う。
4. 上清の全量を 2 ml 容エッペンチューブに移す。この時、泥粒子が入らないように注意する。
5. 250 µl の PPS を添加し、10 回転倒混合する。
6. 14,000×g で 5 分間、遠心分離を行う。
7. 上清の全量を 4.0 ml 容プラスチックバイアルに移す。この時、沈殿を入れないように注意する。
8. Biding Matrix Suspension を 1 ml 添加する。Biding Matrix Suspension は沈殿しているので使用直前に良く混合すること。試料が多い場合、添加している途中でも沈殿してくるので、添加する直前に混合する。
9. ローテーターあるいは手で 2 分間、混合する。
10. チューブラックに立て 3 分間、放置する。
11. 上澄み 500 µl を 取り除く。この時、Biding Matrix を吸わないように注意する。
12. SPIN™ Filter を受けのチューブにセットする。
13. 残りの Biding Matrix を懸濁させ、約 600 µl を SPIN™ Filter にいれる。
14. 14,000×g で 1 分間、遠心分離を行う。
15. 受けのチューブに入ったろ液を捨て、再び SPIN™ Filter をセットする。
16. Biding Matrix がなくなるまで⑬～⑮を繰り返す。
17. SPIN™ Filter に 500 µl の SEWS-M を加える（SEWS-M にエタノールを添加していることを確認すること）。
18. 14,000×g で 1 分間、遠心分離を行う。
19. 受けのチューブに入ったろ液を捨て、再び SPIN™ Filter をセットする。
20. Biding Matrix に残存する SEWS-M を完全に取り除くために、更に 14,000×g で 2 分間、遠心分離を行う。
21. SPIN™ Filter を Catch Tube（キットに付属）にセットする。
22. SPIN™ Filter を 5 分間、室温で放置し、乾燥させる。
23. 50 µl の DES を添加し、緩やかに混合する。
24. 14,000×g で 1 分間、遠心分離を行い、SPIN™ Filter を捨てる。
25. 得られた DNA 溶液は-20℃以下で冷凍保存する。

５．トラブルシューティング

６．是正措置

****

環境 DNA チップ用

ハイブリダイゼーション・プロトコール

＜海底泥中の微生物群の DNA 組成解析＞

****

第 2 版

2011 年 2 月 17 日

日本ソフトウェアマネジメント株式会社

独立行政法人水産総合研究センター
中央水産研究所
水産遺伝子解析センター

変更改訂履歴

版数	変更改訂年月日	改訂・変更理由及び内容
原案	2009/02/23	原案の作成。
1版	2010/2/4	全体を ISO 準拠フォーマットに改訂。
2 版	2011/2/17	表紙タイトル「海底泥中の微生物群組成解析のための環境 DNA チップ用 ハイブリダイゼーション・プロトコール」から「環境 DNA チップ用 ハイブリダイゼーション・プロトコール ＜海底泥中の微生物群の DNA 組成解析＞」に改訂。
		変更改訂履歴の「承認」「審査」「作成」項目を削除。
		「２． 一般事項」に「略号資料」、「一般事項」項目追加を加筆。
		「４．９ コントロール DNA テンプレートの作成」を加筆。
		蛍光標識手法を「3DNA 法（ハイブリダイゼーション時に同時蛍光標識も行う手法）」から「非増幅直接蛍光標識法（蛍光標識を行ってからハイブリダイゼーションを行う手法）」への変更を反映。
		別紙 001「ご意見依頼票」を改訂。
		別紙 002「採泥記録簿」、別紙 003「DNA チップ作成記録簿」、別紙 004「DNA 抽出記録簿」、別紙 005「送付記録簿」、別紙 006「受領記録簿」を加筆。
		全体をレビューし、誤字、脱字、間違った表現や数値を修正、体裁を改訂。

目 次

１． 適用範囲

本プロトコールは、環境 DNA チップを使ったハイブリダイゼーション法による海底泥中の微生物群 DNA 組成解析を目的とする。

海底泥から抽出した微生物群総 DNA 溶液から亜硫酸還元酵素遺伝子領域、アンモニア酸化酵素遺伝子領域、リボソーム RNA 遺伝子領域を PCR 法にて増幅したハイブリダイゼーション用 DNA の調製、ハイブリダイゼーション用 DNA の蛍光標識、ハイブリダイゼーション、環境 DNA チップ（＊１）の洗浄、環境 DNA チップの蛍光量検出、検出データの数値化解析までを適用範囲とする。

＊１：環境 DNA チップとは、海底泥の微生物群 DNA 組成を検出でき、漁場の環境状態を検査することを目的に作成された DNA チップである。1 枚のスライドガラス上に、3 種類の遺伝子クローンから設計された 23 塩基の化学合成 DNA を貼り付けた DNA チップである。

２． 一般事項

２．１ 略号資料

- ゲノム DNA 溶液：海底泥から抽出した微生物群総 DNA 溶液。
- dsrB：亜硫酸還元酵素遺伝子領域。
- amoA：アンモニア酸化酵素遺伝子領域。
- 16s rRNA：リボソーム RNA 遺伝子領域。
- ターゲット DNA ：PCR 法にて増幅したハイブリダイゼーション用 DNA。
- 蛍光標識 DNA：蛍光標識処理を行った DNA。
- 蛍光標識コントロール：蛍光標識反応時に使用するコントロール DNA。
- ハイブリコントロール：ハイブリダイゼーション時に使用するコントロール DNA。
- プレートカバー：96 穴 PCR プレート全体の蓋として使用するシリコンカバー。
- ハイブリカセット：ハイブリダイゼーション時に DNA チップを保湿するカセット容器。
- PCR 産物：PCR 反応後の PCR 反応液。
- 電気泳動サンプル：PCR 反応後の陰性対照サンプル、PCR 産物を電気泳動確認用に分取したもの。
- PCR 産物混合液：PCR 産物の精製時に PCR 産物と酢酸ナトリウム液を混合した溶液。
- PCR 精製産物：精製処理後の PCR 産物。
- DNA チップ表面処理液：DNA チップ表面処理用に用事調製された溶液。
- マスキング処理：ハイブリダイゼーション時、ガラス表面に非特異的な DNA 結合が起こらないように DNA チップ表面をマスキングする処理。

２．２ 一般事項

１） 薬品、化学物質の取扱い、保管に関しては、使用物質の MSDS（＊２）を確認の上、関係する法令、取扱い、保管事項を厳守し、実験を行う組織、施設の規約に従うこと。

２） 実験施設、機器の使用については、実験を行う組織、施設の規約に従い、機器については付属の取扱説明書を読み、不明な事項があれば製造、販売メーカーに確認しておくこと。

３） 機器の点検においては、実験を行う組織、施設の規約に従い、機器付属の取扱説明書または製造、販売メーカーが推奨する日常点検、定期点検を行うこと。

４） 機器、器具、試薬、キット等の取り扱いについては、取扱説明書、使用マニュアル等をよく読んだ上、不明な事項があれば使用前に製造、販売メーカーへ問い合わせておくこと。

５） 試薬、試薬キットの取り扱い、保管環境、使用期限等については、取扱説明書、使用マニュアル等をよく読

んだ上、不明な事項があれば使用前に製造、販売メーカーに確認しておくこと。

6） 全ての作業に関して、ノート等に必ず記録を残すこと。（＊３）

※複数組織間で行うサンプルの受け渡しや情報共有する重要事項に関しては、別紙 002「採泥記録簿」、別紙 003「DNA チップ作成記録簿」、別紙 004「DNA 抽出記録簿」、別紙 005「送付記録簿」、別紙 006「受領記録簿」を使用して記録し、関係組織間で保存すること。

7） 本プロトコールの不明箇所指摘、改善依頼、トラブル報告、クレーム等に関しては、別紙001「ご意見依頼票」に内容を記載し、プロトコール作成機関に連絡すること。

＊２：MSDS（化学物質安全性データシート）は、使用する薬品、化学物質の製造、販売メーカーから入手が可能である。

＊３：記録は、実験操作だけでなく、サンプルの受け取りや送付等も含め、関連する全ての作業において残す必要がある。

3． プロトコールの原理

海底泥から抽出したゲノム DNA 溶液から PCR 法にて増幅した 3 種類のターゲット DNA と蛍光蛍光標識コントロール DNA を加えて 4 種類の DNA を混合し、蛍光標識する。蛍光標識したターゲット DNA と別途蛍光標識したハイブリダイゼーションコントロール DNA を混合して、環境 DNA チップ上の DNA と結合させる。検出器により発光を検出し、検出した画像データをソフトウェアにて数値化解析し、得られた数値データを解析する事で海底泥中の微生物群 DNA 組成を知ることができる。

4． 実験手法

ここでは、試薬類、機器類、器具類および実験操作に関する内容を記載する。

4．1 はじめに

本プロトコールに関して

本プロトコールは、分子生物学実験、特に DNA を取り扱う実験に 3 年以上従事している経験者を対象としたものである。

DNA 取り扱い実験の未経験者、経験不足者が本プロトコールを利用する際は、実験入門書籍（＊4）等を熟読した上で、経験者による内容補足説明、実験指導の下に実験を行う必要がある。

＊4：以下、参考として実験入門書籍の一部を記す。

- バイオ実験イラストレイテッド第１巻/秀潤社 ISBN4-87962-148-X
- バイオ実験イラストレイテッド第２巻/秀潤社 ISBN4-87962-149-8
- 超基本バイオ実験ノート/羊土社 ISBN 9784897069203

4．2 購入試薬

1）コントロール DNA テンプレート作成関連試薬

・ 化学合成 DNA	品名：オリゴ DNA 合成受託 メーカー・型番：グライナージャパン オリゴ DNA 合成受託 ※化学合成する DNA 配列は、各操作項目に記載。
・ DNA 合成酵素（EX）	品名：Ex Taq Hot Start Version メーカー・型番：TaKaRa RR006A
・ 滅菌蒸留水	品名：Distilled Water, Deionized, Sterile

	メーカー・型番：ニッポンジーン 316-90101
・ TA クローニングキット	品名：pGEMR-T Easy Vector with DH5α
	メーカー・型番：プロメガ TOYDH5
・ プラスミド抽出キット	品名：QIAprep Spin Miniprep Kit
	メーカー・型番：QIAGEN 27104
・ 寒天培地用試薬	品名：LB 寒天培地「ダイゴ」
	メーカー・型番：和光純薬 393-00881
・ 大腸菌培養用試薬	品名：LB 培地「ダイゴ」
	メーカー・型番：和光純薬 396-00871
・ 抗生物質（Amp）	品名：アンピシリンナトリウム
	メーカー・型番：和光純薬 016-10373
・ 発色基質試薬	品名：X-Gal
	メーカー・型番：TaKaRa 9031
・ 発色基質溶解液	品名：N,N-ジメチルホルムアミド
	メーカー・型番：和光純薬 045-29192
・ 1M トリス-塩酸緩衝溶液（pH 8.0）	品名：1M Tris-HCl（pH 8.0） 100ml
	メーカー・型番：ニッポンジーン 312-90061
・ 電気泳動用寒天末	品名：Agarose S
	メーカー・型番：ニッポンジーン 312-01193
・ 電気泳動用添加液	品名：6x Loading Buffer
	メーカー・型番：TaKaRa 9156
・ 濃縮電気泳動溶液	品名：50X TAE
	メーカー・型番：ニッポンジーン 313-90035
・ サイズマーカー	品名：100bp DNA ラダーマーカー
	メーカー・型番：ワトソン BRG-100-02
・ DNA 染色液	品名：EtBr Solution
	メーカー・型番：ニッポンジーン 315-90051
・ エタノール	品名：エタノール（99.5%）
	メーカー・型番：Wako 057-00456

2）PCR 関連試薬

・ 化学合成 DNA	品名：オリゴ DNA 合成受託
	メーカー・型番：グライナージャパン オリゴ DNA 合成受託
	※化学合成する DNA 配列は、各操作項目に記載。
・ DNA 合成酵素（KOD）	品名：KOD FX
	メーカー・型番：TOYOBO KFX-101
・ 滅菌蒸留水	品名：Distilled Water, Deionized, Sterile
	メーカー・型番：ニッポンジーン 316-90101
・ PCR 産物精製キット	品名：QIAquick PCR Purification Kit
	メーカー・型番：QIAGEN 28104
・ 酢酸ナトリウム溶液	品名：3M Sodium Acetate
	メーカー・型番：ニッポンジーン 316-90081

- 1M トリス−塩酸緩衝溶液（pH 8.0）　品名：1M Tris−HCl（pH 8.0） 100ml
  メーカー・型番：ニッポンジーン 312-90061
- 電気泳動用寒天末　品名：Agarose S
  メーカー・型番：ニッポンジーン 312-01193
- 電気泳動用添加液　品名：6x Loading Buffer
  メーカー・型番：TaKaRa 9156
- 濃縮電気泳動溶液　品名：50X TAE
  メーカー・型番：ニッポンジーン 313-90035
- サイズマーカー　品名：100bp DNA ラダーマーカー
  メーカー・型番：ワトソン BRG−100−02
- DNA 染色液　品名：EtBr Solution
  メーカー・型番：ニッポンジーン 315-90051

3） DNA チップ調製関連試薬

- エタノール　品名：エタノール（99.5%）
  メーカー・型番：Wako 057−00456
- 無水こはく酸　品名：無水こはく酸
  メーカー・型番：Wako 194−04352
- 1M ホウ酸ナトリウム溶液（pH 8.0）　品名：1M ホウ酸ナトリウム溶液（pH 8.0）
  メーカー・型番：ニッポンジーン 受託調製
  ※1M ホウ酸水溶液を水酸化ナトリウムで pH を 8.0 に調製し、フィルター滅菌処理した溶液作成を受託。
- 1−Methyl−2−pyrrolidinone, anhydrous　品名：1−Methyl−2−pyrrolidinone, anhydrous（99.5%）
  メーカー・型番：SIGMA−ALDRICH 328634−1L

4） ターゲット DNA の蛍光標識、ハイブリダイゼーション、DNA チップ洗浄関連試薬

- ハイブリダイゼーション溶液　品名：ExpressHyb Hybridization Solution
  メーカー・型番：クロンテック 636831
- 滅菌蒸留水　品名：Distilled Water, Deionized, Sterile
  メーカー・型番：ニッポンジーン 316-90101
- DNA 蛍光標識キット　品名：arrayCGH Labeling Kit, Cy3/Cy5, ULS
  メーカー・型番：フナコシ EA−005
- 20x SSC 溶液　品名：20x SSC
  メーカー・型番：インビトロジェン 15557−044
- 10% SDS 溶液　品名：10% SDS
  メーカー・型番：インビトロジェン 24730−020

４．３ 調製試薬

ここでは自己調製が必要な試薬の調製方法および保存方法について記す。

※試薬、使用機器添付の取扱説明書を必ず参照すること。

- 電気泳動溶液

  1） 2000ml プラスチック体積計で超純水 1960ml を計量し、2000ml プラスチックびんに入れる。

  2） 50ml ピペットで 50X TAE 40ml を計量し、超純水に加える。

3） 2000ml プラスチックびんの蓋をしっかり閉め、20 回転倒混和し、電気泳動溶液とする。
※室温で1ヶ月保存可能

・ 10mM トリス−塩酸緩衝溶液
1） 25ml プラスチックピペットで滅菌蒸留水 30ml を 50ml チューブに入れる。
※25ml プラスチックピペットの拡張目盛で 30ml を計量する。
2） 10ml プラスチックピペットで滅菌蒸留水 9.6ml を1）の 50ml チューブに加え、39.6ml の滅菌蒸留水とする。
3） 1000ul マイクロピペットで 1M トリス−塩酸緩衝溶液（pH 8.0） 400ul を滅菌蒸留水に加える。
4） 50ml チューブのキャップをしっかり閉め、20 回転倒混和し、10mM トリス−塩酸緩衝溶液とする。
※室温で 6 ヶ月間保存可能。

・ 電気泳動用サイズマーカー
1） 1.5ml マイクロチューブ 10 本に 100ul マイクロピペットでサイズマーカーを 50ul ずつ計量、分注する。
2） サイズマーカーを分注した 1.5ml マイクロチューブを冷凍庫（−20～−30℃）に保管し、サイズマーカーストックとする。
※−20～−30℃で 6 ヶ月保存可能。
3） 常時使用するサイズマーカーとして、サイズマーカーストックから 1 本ずつ冷蔵庫（4℃）保管に移し、電気泳動時に使用する。
※冷蔵庫（4℃）で 3 ヶ月保存可能。 1 度解凍したサイズマーカーは再冷凍しないこと。

・ 抗生物質（Amp）溶液（濃度：100mg/ml）
1） 冷蔵（4℃）保管の抗生物質（Amp）（アンピシリンナトリウム（粉末））を室温で 15 分程度放置し、試薬を室温に戻す。
2） 10ml ピペットで 15ml チューブに滅菌蒸留水 5ml を入れる。
3） 計量器にてアンピシリンナトリウム 1g を計量し、15ml チューブの滅菌蒸留水に加える。
4） 攪拌器メモリ 1 で 10 秒間混合する。
以降のステップは、無菌操作フード内で行う。
5） 注射筒のポンプを抜き取り、溶液滅菌フィルター（注射筒用）を注射筒先端に取り付ける。
※抜き取ったポンプは、新しいラップ等の上に置き、ゴムの部分が汚染しないように気を付ける。
6） 新しい 15ml チューブをチューブ用試験管立てに立て、蓋を開ける。
7） 4）で混合したアンピシリンナトリウム溶液をデカントで注射筒内に流し込む。
8） 注射筒にポンプを戻し、新しい 15ml チューブにアンピシリンナトリウム溶液を押し出してフィルター滅菌する。
9） 5ml ピペットでフィルター滅菌したアンピシリンナトリウム 1ml を 1.5ml マイクロチューブに分注し、抗生物質（Amp）溶液とする。
※1.5ml マイクロチューブは、滅菌済のものを使用する。
10） 分注した抗生物質（Amp）溶液をマイクロチューブ保存ボックスに入れ、冷凍庫（−20℃）保管する。

・ 発色基質溶液（濃度：2%）
1） 冷凍（−20℃）保管の発色基質試薬（X−Gal（粉末））を室温で 15 分程度放置し、試薬を室温に戻す。
2） 10ml ピペットで 15ml チューブに発色基質溶解液（N,N−ジメチルホルムアミド） 5ml を入れる。

3） 計量器にて X-Gal 100mg を計量し、15ml チューブの N,N-ジメチルホルムアミドに加える。
4） 攪拌器メモリ 1 で 10 秒間混合する。
5） 5ml ピペットで X-Gal 溶液　1m を 1.5ml マイクロチューブに分注し、発色基質溶液とする。
6） 分注した発色基質溶液をマイクロチューブ保存ボックスに入れ、冷凍庫（-20℃）保管する。

・ 寒天培地
1） 500ml プラスチック体積計で超純水　500ml を計量し、1000ml 三角フラスコに入れ、回転子（大）を入れる。
2） 寒天培地用試薬（LB 寒天培地「ダイゴ」）を 500ml 分（スティック 5 本）加える。
3） 1000ml 三角フラスコの口を 4 重のアルミホイルで覆い、強力マグネット回転装置メモリ 750 にて 3 分間回転子を回転させ試薬を溶かす。
※試薬は、寒天末を含むため完全溶解はしない。その他の試薬を溶かすことが目的のため、3 分間試薬溶かしたら終了してよい。
4） 1000ml 三角フラスコを高圧蒸気滅菌機にセットし、121℃、20 分間滅菌を行う。
5） 滅菌処理後の 1000ml 三角フラスコを強力マグネット回転装置に置き、メモリ 500 にて回転子を回転させながら室温で 40 分～1 時間放置し、50℃程度になるまで冷ます。
※外気温により冷ます時間は異なる。
6） 無菌操作フード内で寒天培地溶液に 1000ul マイクロピペットで抗生物質（Amp）溶液　500ul、発色基質溶液 1000ul を加え、強力マグネット回転装置メモリ 500 にて 3 分間回転子を回転させ混合する。
※終濃度：アンピシリン 100ug/ml、発色基質溶液　0.004%。
7） 無菌操作フード内で寒天培地溶液を三角フラスコから直接プラスチックシャーレに分注する。
※寒天培地溶液が 5mm 厚になる程度分注する。
8） 無菌操作フード内で 1 時間室温放置し、寒天培地を固める。
9） 寒天培地を冷蔵（4℃）庫に保存する。

・ 大腸菌培養液
1） 500ml プラスチック体積計で超純水　500ml を計量し、500ml ガラス瓶に入れる。
2） 寒天培地用試薬（LB 培地「ダイゴ」）を 500ml 分（スティック 5 本）加える。
3） 500ml ガラス瓶の蓋を閉め、20 回転倒混和して試薬を溶かす。
4） 500ml ガラス瓶の蓋を 4 重のアルミホイルで覆う。
5） 500ml ガラス瓶の蓋を緩めて高圧蒸気滅菌機にセットし、121℃、20 分間滅菌を行う。
6） 滅菌処理後の大腸菌培養液が完全に室温まで下がるまで放置（5 時間以上）し、蓋を閉める。
7） 大腸菌培養液を室温保管する。

・ ハイブリダイゼーション溶液
1） ハイブリダイゼーション溶液に成分析出が無いか確認する。（ハイブリダイゼーション溶液外気温が低い場合、成分析出が発生する）
確認項目
・ ハイブリダイゼーション溶液が白濁していないか確認する。
・ ハイブリダイゼーション溶液ボトルの底に透明の沈殿物がないか確認する。
2） ハイブリダイゼーション溶液のボトルをゆっくり 30 回転倒混和する。
※ハイブリダイゼーション溶液は粘性が高い。

3）1.5ml マイクロチューブ 10 本に 1000ul マイクロピペットでハイブリダイゼーション溶液を 1ml ずつ計量、分注する。

4）1.5ml マイクロチューブの蓋をしかり閉め、室温保存する。

４．４ 機器

1）コントロール DNA テンプレート作成関連用機器

・DNA 増幅装置	品名：Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700 メーカー・型番：ライフテクノロジーズ 9700G
・ブロック恒温器	品名：ドライサーモユニット メーカー・型番：タイテック DTU-Mini
・ブロック恒温器用アルミブロック	品名：マイクロチューブ用ハーフブロック メーカー・型番：タイテック B-1120 A
・恒温器	品名：ヒータ式インキュベータ メーカー・型番：サンヨー MIR-162
・恒温振とう培養器	品名：バイオシェーカー メーカー・型番：タイテック BR-21FP・MR
・微量高速遠心機	品名：微量高速冷却遠心機 メーカー・型番：TOMY MX-301
・微量高速遠心機用ローター・ラック	品名：ラック・イン・ローター、ラック メーカー・型番：TOMY TMA-300、AR015-24
・攪拌器	品名：ボルテックスミキサー（ジェニー2） メーカー・型番：アズワン 2-6863-01
・卓上簡易遠心機	品名：小型微量遠心機 メーカー・型番：TOMY PMC-060
・微量高速遠心機	品名：微量高速冷却遠心機 メーカー・型番：TOMY MX-301
・微量高速遠心機用ローター・ラック	品名：ラック・イン・ローター、ラック メーカー・型番：TOMY TMA-300、AR015-24
・電気泳動装置	品名：Mupid-exU メーカー・型番：ADVANCE EXU-1
・電気泳動寒天撮影装置	品名：BioDoc-It System, 8-inch Monitor, 100V, with LMS-20 Transilluminator, with Digital Printer メーカー・型番：フナコシ 97-0170-03K
・DNA 濃度測定装置	品名：NanoDrop 1000 メーカー・型番：LMS ND-1000
・電子レンジ	品名：電子レンジ メーカー・型番：アズワン 1-9178-02
・冷凍冷蔵庫	品名：バイオマルチクーラー メーカー・型番：日本フリーザー KGT-4056HC
・超低温冷凍庫	品名：超低温フリーザー メーカー・型番：サンヨー MDF-U482

・ 製氷機　品名：フレークアイスメーカー
メーカー・型番：ホシザキ　FM-120F
・ 無菌操作フード　品名：バイオハザード対策用キャビネット
メーカー・型番：サンヨー　MHE-132AJ
・ 高圧蒸気滅菌機　品名：オートクレーブ
メーカー・型番：TOMY　SX-300
・ 超純水製造装置　品名：Direct-Q UV
メーカー・型番：ミリポア　Direct-Q UV
・ 計量器　品名：分析天秤
メーカー・型番：アズワン　1-9284-03

2） PCR 関連用機器

・ 攪拌器　品名：ボルテックスミキサー（ジェニー2）
メーカー・型番：アズワン　2-6863-01
・ 卓上簡易遠心機　品名：小型微量遠心機
メーカー・型番：TOMY PMC-060
・ 微量高速遠心機　品名：微量高速冷却遠心機
メーカー・型番：TOMY MX-301
・ 微量高速遠心機用ローター・ラック　品名：ラック・イン・ローター、ラック
メーカー・型番：TOMY TMA-300、AR015-24
・ DNA 増幅装置　品名：Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700
メーカー・型番：ライフテクノロジーズ　9700G
・ 電気泳動装置　品名：Mupid-exU
メーカー・型番：ADVANCE EXU-1
・ 電気泳動寒天撮影装置　品名：BioDoc-It System, 8-inch Monitor, 100V, with LMS-20 Transilluminator, with Digital Printer
メーカー・型番：フナコシ　97-0170-03K
・ DNA 濃度測定装置　品名：NanoDrop 1000
メーカー・型番：LMS ND-1000
・ DNA 溶液濃縮装置　品名：遠心濃縮機
メーカー・型番：TOMY　CC-105
・ DNA 溶液濃縮装置用付属品一式　品名：冷却トラップ、真空ポンプ、ローター
メーカー・型番：TOMY TU-1000、GCD-051X、TCA-72、ガラストラップ B
・ 電子レンジ　品名：電子レンジ
メーカー・型番：アズワン　1-9178-02
・ 冷凍冷蔵庫　品名：バイオマルチクーラー
メーカー・型番：日本フリーザー　KGT-4056HC
・ 製氷機　品名：フレークアイスメーカー
メーカー・型番：ホシザキ　FM-120F

3） DNA チップ調製用機器

・ 沸騰装置　品名：ホットマグネットスターラー

メーカー・型番：アズワン　1-6607-11

・ 強力マグネット回転装置　　品名：ハイパワースターラー
メーカー・型番：アズワン 1-4603-11

・ 96 穴プレート遠心機　　品名：プレート遠心機
メーカー・型番：TOMY LX140

・ 96 穴プレート遠心機用付属品一式　　品名：ローター、バケット、ラック
メーカー・型番：TOMY TS-35LB、A138-96、S1596-04

・ 計量器　　品名：分析天秤
メーカー・型番：アズワン 1-9284-03

・ 製氷機　　品名：フレークアイスメーカー
メーカー・型番：ホシザキ FM-120F

・ 電動ピペッター　　品名：エクスプレス　ポータブルピペットエイド
メーカー・型番：ベクトン・ディッキンソン 357590

・ 超純水製造装置　　品名：Direct-Q UV
メーカー・型番：ミリポア Direct-Q UV

・ 電気式乾燥保管容器　　品名：ステンレス小型オートドライデシケーター
メーカー・型番：アズワン　1-6071-01

4）ターゲット DNA の蛍光標識、ハイブリダイゼーション、DNA チップ洗浄関連用機器

・ ブロック恒温器　　品名：ドライサーモユニット
メーカー・型番：タイテック DTU-Mini

・ ブロック恒温器用アルミブロック　　品名：マイクロチューブ用ハーフブロック
メーカー・型番：タイテック B-1120 A

・ ミニブロック恒温器　　品名：AccuBlock Mini Cmpact Digital Dry Bath Incubator
メーカー・型番：BM 機器　D0100

・ 恒温器　　品名：ヒータ式インキュベータ
メーカー・型番：サンヨー　MIR-162

・ DNA チップ用検出器　　品名：DNA マイクロアレイスキャナシステム
メーカー・型番：アジレント　G2565CA

・ 強力マグネット回転装置　　品名：ハイパワースターラー
メーカー・型番：アズワン 1-4603-11

・ 96 穴プレート遠心機　　品名：プレート遠心機
メーカー・型番：TOMY LX140

・ 96 穴プレート遠心機用付属品一式　　品名：ローター、バケット、ラック
メーカー・型番：TOMY TS-35LB、A138-96、S1596-04

・ 計量器　　品名：分析天秤
メーカー・型番：アズワン 1-9284-03

・ 製氷機　　品名：フレークアイスメーカー
メーカー・型番：ホシザキ FM-120F

・ 電動ピペッター　　品名：エクスプレス　ポータブルピペットエイド
メーカー・型番：ベクトン・ディッキンソン 357590

・ 超純水製造装置　　品名：Direct-Q UV

・ 攪拌器 品名：ボルテックスミキサー(ジェニー2)

メーカー・型番：ミリポア Direct-Q UV

・ 攪拌器
品名：ボルテックスミキサー(ジェニー2)
メーカー・型番：アズワン 2-6863-01

・ 卓上簡易遠心機
品名：小型微量遠心機
メーカー・型番：TOMY PMC-060

・ 微量高速遠心機
品名：微量高速冷却遠心機
メーカー・型番：TOMY MX-301

・ 微量高速遠心機用付属品一式
品名：ラック・イン・ローター、ラック
メーカー・型番：TOMY TMA-300、AR015-24

・ DNA 濃度測定装置
品名：NanoDrop 1000
メーカー・型番：LMS ND-1000

・ DNA 溶液濃縮装置
品名：遠心濃縮機
メーカー・型番：TOMY CC-105

4．5 器具・プラスチック消耗品

1） DNA サンプル保管、コントロール DNA テンプレート作成、PCR 関連

・ 96 穴 PCR プレート
品名：マルチセミスカーテッド PCR プレート
メーカー・型番：日本ジェネティクス 35801
必要数：サンプル処理数から算出

・ PCR プレート用シリコンカバー
品名：Silicone Expansion Mat for 96 well PCR Plate,AxyMat
メーカー・型番：フナコシ CM-96-EXP
必要数：20 枚程度
※洗浄、高圧蒸気滅菌により再利用可能。

・ 96 穴プレート氷冷用アルミラック
品名：アイスオン 2 型
メーカー・型番：フナコシ IO-2
必要数：1 個

・ 96 穴 PCR プレート用 8 連キャップ
品名：スタンダードドームキャップ
メーカー・型番：BM 機器 PCR-8C
必要数：サンプル処理数から算出

・ 96 穴 PCR プレートラック
品名： PCR チューブラック
メーカー・型番：ワトソン 2512-922B
必要数：1 個

・ 10ul マイクロピペット
品名：PIPETMAN Ultra U10
メーカー・型番：エムエス機器 F21022
必要数：1 個

・ 20ul マイクロピペット
品名：PIPETMAN Ultra U20
メーカー・型番：エムエス機器 F21023
必要数：1 個

・ 100ul マイクロピペット
品名：PIPETMAN Ultra U100
メーカー・型番：エムエス機器 F21024
必要数：1 個

・ 200ul マイクロピペット　品名：PIPETMAN Ultra U200
メーカー・型番：エムエス機器　F21025
必要数：1 個

・ 1000ul マイクロピペット　品名：PIPETMAN Ultra U1000
メーカー・型番：エムエス機器　F21026
必要数：1 個

・ 10ul フィルター付マイクロピペット用チップ　品名：フィルターチップ 10ul
メーカー・型番：ワトソン　124-10S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 20ul フィルター付マイクロピペット用チップ　品名：フィルターチップ 20ul
メーカー・型番：ワトソン　124-20S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 100ul フィルター付マイクロピペット用チップ　品名：フィルターチップ 100ul
メーカー・型番：ワトソン　124-100S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 200ul フィルター付マイクロピペット用チップ　品名：フィルターチップ 200ul
メーカー・型番：ワトソン　1252-703CS
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1000 フィルター付マイクロピペット用チップ　品名：フィルターチップ 1000ul
メーカー・型番：ワトソン　124-1000S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1.5ml マイクロチューブ　品名：1.7 ml SnapLock Microtube, Sterilized, MaxyClear
メーカー・型番：フナコシ　MCT-175-C-S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 2ml マイクロチューブ　品名：セイフロックチューブ（2ml）
メーカー・型番：エッペンドルフ　95170（0030 120.094）
必要数：サンプル処理数から算出

・ 0.2mlPCR シングルチューブ　品名：0.2 ml PCR Tube with Dome Cap, Thin-Wall, Non-Sterile, MaxyClear
メーカー・型番：フナコシ　PCR-02D-C
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1.5ml マイクロチューブスタンド　品名：ECO ラック　96 穴
メーカー・型番：ワトソン　1521-902W
必要数：サンプル処理数から算出
※実験中間産物の一時保管用としても使用するため、算出時に考慮する。

・ マイクロチューブ保存ボックス　品名：チューブラック 1.5/2.0ml チューブ用 50 穴
メーカー・型番：ワトソン　2572-502N
必要数：サンプル保存数から算出

・ 15ml チューブ　品名：遠沈管（15ml）
メーカー・型番：IWAKI　11-039-004

必要数：サンプル処理数から算出

・ 三角フラスコ（300ml）　品名：三角フラスコ（300ml）
メーカー・型番：AGC　71-008-014
必要数：1 個

・ 三角フラスコ（1000ml）　品名：三角フラスコ（1000ml）
メーカー・型番：AGC　71-008-018
必要数：1 個

・ 500ml ガラス瓶　品名：メジュームびん（500ml）
メーカー・型番：AGC　71-023-012
必要数：1 本

・ 100ml プラスチックビーカー　品名：TPX ビーカー（100ml）
メーカー・型番：アズワン　6-219-01
必要数：1 個

・ 300ml プラスチックビーカー　品名：TPX ビーカー（300ml）
メーカー・型番：アズワン　6-219-03
必要数：1 個

・ 500ml プラスチックビーカー　品名：TPX ビーカー（500ml）
メーカー・型番：アズワン　6-219-04
必要数：1 個

・ 注射筒　品名：テルモシリンジ（針無し）10ml
メーカー・型番：アズワン　1-4908-05
必要数：1 本

・ 溶液滅菌フィルター（注射筒用）　品名：シリンジフィルター
メーカー・型番：AGC　82-064-004
必要数：1 個

・ プラスチックシャーレ　品名：滅菌シャーレ（BIO-BIK）
メーカー・型番：アズワン　6-8626-03
必要数：サンプル処理数から算出

・ 回転台　品名：ターンテーブル手動式
メーカー・型番：アズワン　2-5057-01
必要数：1 個

・ コンラージ棒　品名：コーンラージ棒
メーカー・型番：アズワン　6-489-01
必要数：サンプル処理数から算出

・ 爪楊枝　品名：やなぎ楊枝 L-350
メーカー・型番：やなぎプロダクツ　L-350
必要数：サンプル処理数から算出

・ 汚染物滅菌袋　品名：滅菌用耐熱 PP 袋
メーカー・型番：アズワン　8-7479-01
必要数：数枚

・ ピンセット　品名：標準型ピンセット

メーカー・型番：アズワン　7-164-04
必要数：1 個

・ 1.5ml マイクロチューブ用アルミラック
品名：アイスオン 1 型
メーカー・型番：フナコシ　IO-1
必要数：1 個

・ ゴム手袋
品名：ダイヤモンドグリッププラス
メーカー・型番：BM 機器　DGP-350-S
必要数：1 箱

・ ラップ
品名：ラップ
メーカー・型番：アズワン　1-8063-01
必要数：1 個

・ DNA 染色容器
品名：タイトボックス（導電タイプ）
メーカー・型番：アズワン　9-5618-04
必要数：2 個
※染色用、脱色用、2 個必要。

・ DNA 染色液処理システム
品名：Bind-ET System Complete <Ethidium Removal System>
メーカー・型番：フナコシ　2350
必要数：1 台

・ 薬包紙
品名：薬包紙（大）
メーカー・型番：アズワン　1-4562-03
必要数：10 枚

・ 耐熱手袋
品名：耐熱手袋
メーカー・型番：アズワン　1-7432-01
必要数：1 個

・ マジック
品名：ラボ用マーカー
メーカー・型番：アズワン　2-5674-01
必要数：1 個

・ 氷入れ
品名：クールボックス
メーカー・型番：アズワン　5-235-03
必要数：1 個

・ 1000ml プラスチック体積計
品名：TPX メスシリンダー（1000ml）
メーカー・型番：アズワン　6-236-08
必要数：1 個

・ 2000ml プラスチック体積計
品名：TPX メスシリンダー（2000ml）
メーカー・型番：アズワン　6-236-09
必要数：1 個

・ 250ml ガラス体積計
品名：メスシリンダー（ニューエクセレント、250ml）
メーカー・型番：IWAKI　72-086-011
必要数：1 個

・ 2000ml プラスチックびん
品名：アイボーイ細口びん

メーカー・型番：アズワン　5-001-16
必要数：1 個

・ 回転子（大）　品名：オクタゴン回転子（φ8mm x 51mm）
メーカー・型番：アズワン　1-5407-06
必要数：3 個

・ チューブ用試験管立て　品名：試験管立て（KER30-10）
メーカー・型番：アズワン　2-7915-01
必要数：サンプル処理数から算出

・ 10ml プラスチックピペット　品名：ピペット−ポリスチレン（10ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357551
必要数：サンプル処理数から算出

・ 5ml プラスチックピペット　品名：ピペット−ポリスチレン（5ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357543

・ タイマー　品名：マルチタイマー（切替式）
メーカー・型番：アズワン　2-6122-01
必要数：1 個

2） DNA チップ調製関連

・ 1000ml ガラスビーカー　品名：ビーカー（1000ml）
メーカー・型番：IWAKI　71-001-018
必要数：1 個

・ スライドガラス洗浄容器　品名：スティニングディッシュ
メーカー・型番：サーモフィッシャーサイエンティフィック　100
必要数：5 個

・ スライドガラス洗浄容器蓋　品名：スティニングディッシュカバー
メーカー・型番：サーモフィッシャーサイエンティフィック　101
必要数：1 個

・ スライドガラス洗浄バケット　品名：スティニングアセンブリ
メーカー・型番：サーモフィッシャーサイエンティフィック　102
必要数：2 個
※操作は 1 個で構わないが、遠心時のバランスが必要。

・ 平型フラットピンセット　品名：フラットピンセット
メーカー・型番：アズワン　7-160-07
必要数：1 個

・ スライドガラスケース　品名：プレパラートボックス
メーカー・型番：アズワン　1-4615-02
必要数：サンプル処理数から算出
※DNA チップの未使用品、使用品保管に使用。

・ 1000ml プラスチック体積計　品名：TPX メスシリンダー（1000ml）
メーカー・型番：アズワン　6-236-08
必要数：1 個

・ 300ml プラスチック体積計　品名：TPX メスシリンダー（300ml）

メーカー・型番：アズワン　6-236-06
必要数：1 個

・ 250ml ガラス体積計　品名：メスシリンダー（ニューエクセレント、250ml）
メーカー・型番：IWAKI　72-086-011
必要数：1 個

・ 25ml プラスチックピペット　品名：ピペット-ポリスチレン（25ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357525
必要数：サンプル処理数から算出

・ ゴム手袋　品名：ダイヤモンドグリッププラス
メーカー・型番：BM 機器　DGP-350-S
必要数：1 箱

・ ラップ　品名：ラップ
メーカー・型番：アズワン　1-8063-01
必要数：1 個

・ アルミホイル　品名：アルミホイル
メーカー・型番：アズワン　6-713-07
必要数：1 個

・ 薬包紙　品名：薬包紙（大）
メーカー・型番：アズワン　1-4562-03
必要数：10 枚

・ ペーパータオル　品名：キムタオル
メーカー・型番：アズワン　6-6685-01
必要数：5 枚

・ 氷入れ　品名：クールボックス
メーカー・型番：アズワン　5-235-03
必要数：1 個

・ 50ml チューブ　品名：遠沈管（50ml）
メーカー・型番：IWAKI　11-039-008
必要数：サンプル処理数から算出

・ チューブ用試験管立て　品名：試験管立て（KER30-10）
メーカー・型番：アズワン　2-7915-01
必要数：1 個

・ 回転子（小）　品名：オクタゴン回転子（φ7.5mm x 25mm）
メーカー・型番：アズワン　7-216-03
必要数：1 個

・ タイマー　品名：マルチタイマー（切替式）
メーカー・型番：アズワン　2-6122-01
必要数：1 個

3） ターゲット DNA の蛍光標識、ハイブリダイゼーション、DNA チップ洗浄関連試薬

・ 500ml プラスチックビーカー　品名：TPX ビーカー（手なし、500ml）
メーカー・型番：アズワン　6-219-04

必要数：1 個

・ 1000ml プラスチックビーカー

品名：TPX ビーカー（手なし、1000ml）

メーカー・型番：アズワン　6-219-05

必要数：2 個

・ スライドガラス洗浄容器

品名：スティニングディッシュ

メーカー・型番：サーモフィッシャーサイエンティフィック　100

必要数：6 個

・ スライドガラス洗浄バケット

品名：スティニングアセンブリ

メーカー・型番：サーモフィッシャーサイエンティフィック　102

必要数：サンプル処理数から算出

※遠心時のバランスも必要。

・ 平型フラットピンセット

品名：フラットピンセット

メーカー・型番：アズワン　7-160-07

必要数：1 個

・先曲り平型フラットピンセット

品名：先曲りフラットピンセット

メーカー・型番：アズワン　7-160-10

必要数：1 個

・精密ピンセット

品名：MEISTER ピンセット

メーカー・型番：アズワン　2-8028-21

必要数：1 個

・ スライドガラスケース

品名：プレパラートボックス

メーカー・型番：アズワン　1-4615-02

必要数：サンプル処理数から算出

※反応済 DNA チップの保管に使用。

・ ハイブリダイゼーションカセット

品名：ハイブリカセット

メーカー・型番：BM 機器　THC-1

必要数：サンプル処理数から算出

※パッキン等の消耗部品があるため、予備も準備して
　おくとよい。

・ ハイブリダイゼーション保湿容器

品名：タイトボックス

メーカー・型番：アズワン　5-064-08

必要数：サンプル処理数から算出

※1 個のタイトボックスでハイブリカセット 10 個使用可能。

・ カバーガラス

品名：カバーガラス(24mm x 60mm)

メーカー・型番：マツナミ　C024601

必要数：サンプル処理数から算出

・ 回転子（小）

品名：オクタゴン回転子（φ7.5mm x 25mm）

メーカー・型番：アズワン　7-216-03

必要数：4 個

・ 回転子（大）

品名：オクタゴン回転子（φ8mm x 51mm）

メーカー・型番：アズワン　1-5407-06

必要数：3 個

・ 1000ml プラスチック体積計　　品名：TPX メスシリンダー（1000ml）
メーカー・型番：アズワン　6-236-08
必要数：1 個

・ 300ml プラスチック体積計　　品名：TPX メスシリンダー（300ml）
メーカー・型番：アズワン　6-236-06
必要数：1 個

・ 2ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U2
メーカー・型番：エムエス機器　F21021
必要数：1 個

・ 10ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U10
メーカー・型番：エムエス機器　F21022
必要数：1 個

・ 20ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U20
メーカー・型番：エムエス機器　F21023
必要数：1 個

・ 100ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U100
メーカー・型番：エムエス機器　F21024
必要数：1 個

・ 200ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U200
メーカー・型番：エムエス機器　F21025
必要数：1 個

・ 1000ul マイクロピペット　　品名：PIPETMAN Ultra U1000
メーカー・型番：エムエス機器　F21026
必要数：1 個

・ 10ul フィルター付マイクロピペット用チップ　　品名：フィルターチップ 10ul
メーカー・型番：ワトソン　124-10S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 20ul フィルター付マイクロピペット用チップ　　品名：フィルターチップ 20ul
メーカー・型番：ワトソン　124-20S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 100ul フィルター付マイクロピペット用チップ　　品名：フィルターチップ 100ul
メーカー・型番：ワトソン　124-100S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 200ul フィルター付マイクロピペット用チップ　　品名：フィルターチップ 200ul
メーカー・型番：ワトソン　1252-703CS
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1000 フィルター付マイクロピペット用チップ　　品名：フィルターチップ 1000ul
メーカー・型番：ワトソン　124-1000S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1.5ml マイクロチューブ　　品名：1.7 ml SnapLock Microtube, Sterilized, MaxyClear

メーカー・型番：フナコシ　MCT-175-C-S
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1.5ml マイクロチューブスタンド　品名：ECO ラック　96 穴
メーカー・型番：ワトソン　1521-902W
必要数：サンプル処理数から算出

・ マイクロチューブ保存ボックス　品名：チューブラック 1.5/2.0ml チューブ用 50 穴
メーカー・型番：ワトソン　2572-502N
必要数：サンプル処理数から算出

・ 10ml プラスチックピペット　品名：ピペット-ポリスチレン（10ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357551
必要数：サンプル処理数から算出

・ 25ml プラスチックピペット　品名：ピペット-ポリスチレン（25ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357525
必要数：サンプル処理数から算出

・ 50ml プラスチックピペット　品名：ピペット-ポリスチレン（50ml）
メーカー・型番：BD Falcon　357550
必要数：サンプル処理数から算出

・ ゴム手袋　品名：ダイヤモンドグリッププラス
メーカー・型番：BM 機器　DGP-350-S
必要数：1 箱

・ ラップ　品名：ラップ
メーカー・型番：アズワン　1-8063-01
必要数：1 個

・ アルミホイル　品名：アルミホイル
メーカー・型番：アズワン　6-713-07
必要数：1 個

・ 1.5ml マイクロチューブ用アルミラック　品名：アイスオン 1 型
メーカー・型番：フナコシ　IO-1
必要数：サンプル処理数から算出

・ 1.5ml マイクロチューブスタンド　品名：ECO ラック　96 穴
メーカー・型番：ワトソン　1521-902W
必要数：1 個

・ 回転子固定マグネット　品名：回転子固定マグネット
メーカー・型番：アズワン　7-227-01
必要数：1 個

・ 薬包紙　品名：薬包紙
メーカー・型番：アズワン　1-4562-01
必要数：10 枚

・ ペーパータオル　品名：キムタオル
メーカー・型番：アズワン　6-6685-01
必要数：5 枚

・ペーパーウエス　品名：キムワイプ
メーカー・型番：アズワン　6-6689-01
必要数：10 枚

・氷入れ　品名：クールボックス
メーカー・型番：アズワン　5-235-03
必要数：1 個

・マジック　品名：ラボ用マーカー
メーカー・型番：アズワン　2-5674-01
必要数：1 個

・テープ　品名：ビニルテープ（スーパー88）
メーカー・型番：アズワン　2-1493-01
必要数：1 個

・50ml チューブ　品名：遠沈管（50ml）
メーカー・型番：IWAKI　11-039-008
必要数：サンプル処理数から算出

・チューブ用試験管立て　品名：試験管立て（KER30-10）
メーカー・型番：アズワン　2-7915-01
必要数：サンプル処理数から算出

・タイマー　品名：マルチタイマー（切替式）
メーカー・型番：アズワン　2-6122-01
必要数：1 個

４．６　実験操作場所

実験操作は、以下の環境条件が満たされている場所で行う。

- 試薬、薬品が使用可能であること。
- 実験室内に流しがあり、薬品等が体に付着した場合に洗浄対応可能であること。

４．７　実験操作準備作業

ここでは、実験操作を開始する前に準備として行う作業を記す。

実験を行う組織、施設の規約に従い、使用する実験室のローカルルールも厳守する。

- 実験に使用する試薬類、器具類を操作場所に準備し、不足品が無いか確認する。
- 使用するチューブ等の消耗品にサンプル名、日付等を記載する。
- 実験で使用する機器に関して、使用予約等の必要有無を確認する。
- 実験を開始する場合は、原則として白衣を着用し、使用する薬品によってはマスク、ゴム手袋、保護メガネなどを着用すること。

※薬品、化学物質、試薬キットの準備に関しては、「２．一般事項」参照。

４．８　DNA サンプル、環境 DNA チップの保管

ここでは、海底泥からの DNA 抽出を行う担当機関から入手したゲノム DNA 溶液、環境 DNA チップ作成担当機関から入手した環境 DNA チップそれぞれに関して、受け取り時の処置、保管に関して記す。

・DNA サンプルの保管

原則として、DNA 溶液は凍結融解で DNA を破損させないために、冷蔵庫(4℃)にて保管すること。

A. 容量、濃度測定

ゲノム DNA 溶液は、受け取った際に容量測定(＊5)、濃度測定(＊6)を行う。

＊5:マイクロピペットを使い、ピペットの容量設定つまみを可変しながらゲノム DNA 容量の測定を行う。

＊6:濃度測定の手法は、後述「4.10.2　PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作　準備」を参照。

B. ゲノム DNA 溶液の保管

入手したゲノム DNA 溶液量が 20ul 以下の場合、分注操作は行わず、冷蔵(4℃)保管する。

入手したゲノム DNA 溶液量が 20ul 以上の場合は、下記の操作方法にて溶液を 2 等分に分注し、冷蔵(4℃)保管する。

※分注に関して、操作ミス、サンプル汚染等のトラブル回避のため行うが、ゲノム DNA 溶液量が少ない場合は、乾燥等によるサンプル紛失の危険性が上がるため、行わない方が良い。

また、A. にて測定した結果、濃度が薄い等の理由で多量のゲノム DNA 溶液を今後の操作に使用する場合も、分注は行わない。

分注操作

1) A. にて測定した結果から、分注する容器(1.5ml マイクロチューブ、96 穴 PCR プレート等)を決定し、容器にサンプル名、分注日、使用目的等をマジックで記載する。

※容器への直接記載が困難な場合、記号、キーワード等を記載して記録と照合しながら以降の操作を進めると良い。

2) 受け取ったゲノム DNA 溶液を原液とし、1)にて決定した容器に 100ul マイクロピペットで 50ul ずつ分注する。

3) 分注した容器の蓋をしっかり閉め、冷蔵(4℃)保管する。

分注したゲノム DNA 溶液の 1 つを希釈操作等のワーキングサンプルとし、その他はストック用として保管する。

C. PCR 実験用、希釈ゲノム DNA 溶液の作成

A. にて濃度測定した結果から、dsrB、16s　rRNA 用として終濃度 10ng/ul、amoA 用として 40ng/ul の 2 種類の希釈ゲノム DNA 溶液を作成する。

※必要量に関しては、後述「4.10.1　PCR 増幅、電気泳動による確認操作」を参照し、算出する。

希釈ゲノム DNA 溶液の作成

1) 希釈するゲノム DNA 溶液の必要量を算出した後、ゲノム DNA 原液量、希釈溶媒量を算出する。

2) 希釈溶液を作成する容器(1.5ml マイクロチューブ、96 穴 PCR プレート等)を決定し、容器にサンプル名、分注日、使用目的等をマジックで記載する。

※容器への直接記載が困難な場合、記号、キーワード等を記載して記録と照合しながら以降の操作を進めると良い。

3) 希釈溶液を作成する容器に、希釈溶媒として滅菌蒸留水を必要量入れる。

4) 3)の滅菌蒸留水にゲノム DNA 原液を必要量加える。

5) マイクロピペットで 20 回ピペッティングし、混合する。希釈したゲノム DNA 溶液の 2/3

※ピペッティングする容量は、全量の 2/3 以上で行うこと。

6) 容器の蓋をしっかり閉め、冷蔵(4℃)保管する。

・ 環境 DNA チップの保管

環境 DNA チップを受け取った際、DNA チップ枚数、輸送による破損の有無等を確認すること。

確認が済んだ環境 DNA チップは、電気式乾燥保管容器内で保管すること。

※電気式乾燥保管容器内で 6 ヶ月保存可能。

４．９　コントロール DNA テンプレートの作成操作

はじめに

コントロール DNA は、ターゲット DNA の蛍光標識時に使用する「蛍光標識コントロール」とハイブリダイゼーション時に使用する「ハイブリコントロール」の 2 種類のことである。

概要

各コントロールの 24 塩基の配列および相補鎖配列を化学合成し、アニーリングにより 2 本鎖配列とする。
2 本鎖配列を TA クローニングベクターに組み込み、PCR にて目的産物を増幅、精製し、再度 TA クローニングベクターに組み込み形質転換する。コロニーピッキング（同時にコロニーPCR）にて目的クローンを選択し、プラスミド抽出を行い、ターゲット DNA 調製時のコントロール DNA テンプレートとする。

ここでは、操作方法を簡略化して記すため、ライゲーション、形質転換に関しては、下記 URL から TA クローニングキットマニュアルを入手し、本プロトコール併用して操作を行うこと。

TA クローニングキットマニュアル

http://www.promega.co.jp/jp/jp_tech/jp_manuals/pgem-t.pdf

※PCR 産物の電気泳動確認、濃度測定等に関して、後述の「４．１０　ターゲット DNA の調製」「４．１０．２　PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作」に詳細を記すため、参照すること。
PCR 増幅に関して、必ずテンプレート DNA を含まない陰性対照増幅を行うこと。

準備

- DNA 増幅装置の電源を入れる。
- 氷入れに氷を入れ、96 穴プレート氷冷用アルミラック、1.5ml マイクロチューブ用アルミラックを氷上に置き冷やす。
- 恒温器の電源を入れ、温度を 37℃にセットする。（形質転換、コロニーピッキング操作時）
- ブロック恒温器の電源を入れ、温度を 42℃にセットする。（形質転換操作時）
-
- 冷凍（-20℃）保存してある SOC medilum（TA クローニングキットに付属）を必要数溶かし、室温保存しておく。（形質転換操作時）
- 実験に必要な試薬を氷上に置く。
- 1.5ml マイクロチューブ、96 穴 PCR プレートに PCR 実験を行う予定のサンプル名、作成日等をマジックで記載する。
- 冷蔵（4℃）保管していた寒天培地を室温に戻し、無菌操作フード内で蓋を開け、30 分間乾燥させる。（形質転換操作時）
- 冷凍（-20℃）保存していた抗生物質（Amp）溶液を室温に戻す。（形質転換操作時）
- 爪楊枝を 100ml ビーカーに詰めて 2 重のアルミホイルを被せ、高圧蒸気滅菌機にて 121℃　20 分間滅菌し、無菌操作フード内でアルミホイルを緩めて一晩放置乾燥する。
- 5ml ピペットで大腸菌培養液　3ml を 15ml チューブに入れ、抗生物質（Amp）溶液を 1.5ul 加え転倒混和（10 回）する。（アンピシリン終濃度：100ug/ml）

注意

- 高圧蒸気滅菌機の取り扱いは必ずメーカーマニュアル（機器に付属）を確認して慎重に行うこと。

・　寒天培地の作成に関しては、耐熱手袋を着用して行うこと。

・　大腸菌を扱った器具、消耗品は、汚染物として使用後に滅菌処理を行うこと。

1）化学合成 DNA の混合。

コントロールの化学合成 DNA（＊7）をマイクロピペットにて、下記組成で 0.2mlPCR シングルチューブに混合する。

化学合成 DNA1（10uM）	25ul
化学合成 DNA2（10uM）	25ul
Total volume	50ul

＊7：化学合成 DNA

蛍光標識コントロール

化学合成 DNA1

5'－ AGACGATCATGCTACTGACACGTA -3'

化学合成 DNA2

5'－ ATACGTGTCAGTAGCATGATCGTC -3'

ハイブリコントロール

化学合成 DNA1

5'－ ACCTAGTAGAGCTAGTGCACACGT -3'

化学合成 DNA2

5'－ AACGTGTGCACTAGCTCTACTAGG -3'

2）アニーリング

1）で作成した混合 DNA 溶液を、DNA 増幅装置にて加温処理し、ライゲーションインサートとする。

95℃　5 分→55℃　10 分→4℃

※加温処理後、0.2mlPCR シングルチューブは、96 穴プレート氷冷用アルミラックに立て、氷冷しておく。

理論上、2 本鎖の DNA が作成される。

3）ライゲーション。

TA クローニングキットを使い、マイクロピペットにて下記組成で 0.2mlPCR シングルチューブに混合し、室温で 2 時間ライゲーション反応を行う。

2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5ul
pGEM-T Easy Vector	1ul
インサート	2ul
T4 DNA Ligase	1ul
滅菌蒸留水	1ul
Total volume	10ul

4）PCR 増幅。

Ⅰ. ライゲーション希釈液の作成（ライゲーションサンプルを 10 倍希釈）

新しい 0.2mlPCR シングルチューブに 20ul マイクロピペットで 18ul の滅菌蒸留水を入れ、3）のライゲーションサンプル 2u を加え、攪拌器メモリ 1 で 5 秒間混合、卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。

Ⅱ. Ⅰのライゲーション希釈液をテンプレートとし、PCR 組成（＊8）の試薬をマイクロピペットにて 0.2mlPCR シングルチューブに混合し、PCR 溶液を作成する。

※後述のプライマーセット（＊9）で PCR 反応を行うと、目的するクローンのみ、500bp の PCR 産物が増幅

される。

Ⅲ. PCR 溶液作成後、100ul マイクロピペットのメモリを 90ul に合わせ、泡立てないようにピペッティングを 15 回行い、PCR 溶液を混合する。

＊８:PCR 組成（蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール共通組成）

	1 本分組成	陰性対照
テンプレート	1ul	-
10x EX Taq Buffer	10ul	10ul
2.5mM dNTP mix	8ul	8ul
化学合成 DNA1（10uM）（＊９）	1ul	1ul
化学合成 DNA2（10uM）（＊９）	1ul	1ul
EX Taq	0.5ul	0.5ul
滅菌蒸留水	78.5ul	79.5ul
Total volume	100ul	100ul

＊９:プライマーセット（化学合成 DNA2 に関しては、共通配列）

蛍光標識コントロール用プライマーセット

化学合成 DNA1

5'－ TACGTGTCAGTAGCATGATCGTC –3'

化学合成 DNA2

5'－ CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA –3'

ハイブリコントロール用プライマーセット

化学合成 DNA1

5'－ ACGTGTGCACTAGCTCTACTAGG –3'

化学合成 DNA2

5'－ CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA –3'

5） DNA 増幅装置に 0.2mlPCR シングルチューブをセットし、下記 PCR 反応サイクルにて PCR 反応を行う。

6） PCR 反応終了後、0.2mlPCR シングルチューブを DNA 増幅装置から回収し、氷上に置く。
※冷蔵（4℃）で 1 週間保管可能。

7） 1.5ml マイクロチューブに 10ul マイクロピペットで PCR 反応後溶液 10ul を分取し、電気泳動用添加液 2ul を加え、撹拌器メモリ 1 で 5 秒間混合する。

8） 卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。

9） 電気泳動を行い、500bp の PCR 産物を確認する。
※後述「4．10．1 PCR 増幅、電気泳動による確認操作」ステップ18）参照。
500bp の PCR 産物が確認できない場合、4）からやり直す。

10） 6）の PCR 反応溶液を精製、濃度測定し、インサート 2 とする。
※後述「4．10．2 PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作」参照。

11） ライゲーションを行う。
TA クローニングキットを使い、マイクロピペットにて下記組成で 0.2mlPCR シングルチューブに混合し、室温で 2 時間ライゲーション反応を行う。
※TA クローニングキットマニュアルに従い、陽性コントロール、陰性コントロール実験も同時に行う。
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 5ul

pGEM-T Easy Vector	1ul
インサート 2	2ul
T4 DNA Ligase	1ul
滅菌蒸留水	1ul
Total volume	10ul

12） 形質転換を行う。

下記組成にてライゲーションサンプルと形質転換用大腸菌を混合し、形質転換を行う。

※TA クローニングキットマニュアル参照。

ライゲーションサンプル	10ul
DH5αコンピテントセル	100ul
SOC medium	890ul
Total volume	1000ul

形質転換、簡易手法

Ⅰ. 10ul マイクロピペットでライゲーションサンプル 10ul をコンピテントセル 100ul を加え混合、氷冷した 1.5ml マイクロチューブ用アルミラックにセットし、20 分間氷冷する。

※コンピテントセルは 1.5ml マイクロチューブに入って提供されている。

Ⅱ. 42℃にセットしたブロック恒温器にサンプルを移し、50 秒加温する。

Ⅲ. 氷冷した 1.5ml マイクロチューブ用アルミラックにサンプルを移し、2 分間氷冷する。

Ⅳ. 1000ul マイクロピペットで SOC medium 890ul をライゲーションサンプル、コンピテントセル混合液に加え、そのままゆっくり 3 回ピペッティングする。

Ⅴ. 37℃にセットした恒温器にサンプルを移し、1 時間 30 分加温する。

13） 寒天培地へのプレーティング。

Ⅰ. 形質転換したサンプルを 10 回転倒混和する。

Ⅱ. 回転台に寒天培地をセットし、100ul マイクロピペットで形質転換サンプル 100ul を寒天培地にアプライする。

Ⅲ. 回転台を手動で回転させ、コンラージ棒を使って毛湿転換サンプルを寒天培地全体に染み込ませる。

Ⅳ. 37℃にセットした恒温器に寒天培地を移し、16～20 時間加温する。

※加温時間に関しては、コロニーの大きさ、数を確認しながら調節する。

14） コロニーピッキング、コロニーPCR。

準備

・200ul マイクロピペットで、大腸菌培養液 200ul を 96 穴培養プレート（A 列）10 穴に入れる。

・PCR 組成（＊１０）の試薬をマイクロピペットにて 96 穴 PCR プレート（A 列）１１穴に入れ、1 穴を陰性対照とする。

※サンプルと陰性対照が同じ組成のため、PCR 溶液は 11.5 穴分作成し、。

＊１０：PCR 組成

	1 本分組成	11.5 穴分組成	陰性対照
10x EX Taq Buffer	5ul	57.5ul	10ul
2.5mM dNTP mix	4ul	46ul	8ul
化学合成 DNA1（10uM）（＊１１）	0.5ul	5.75ul	1ul
化学合成 DNA2（10uM）（＊１１）	0.5ul	5.75ul	1ul

DNA 合成酵素（EX）	0.2ul	2.3ul	0.5ul
滅菌蒸留水	39.8ul	457.7ul	79.5ul
Total volume	50ul		50ul

＊11：プライマーセット（化学合成 DNA2 に関しては、共通配列）

蛍光標識コントロール用プライマーセット

化学合成 DNA1

5'－TACGTGTCAGTAGCATGATCGTC－3'

化学合成 DNA2

5'－CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA－3'

ハイブリコントロール用プライマーセット

化学合成 DNA1

5'－ACGTGTGCACTAGCTCTACTAGG－3'

化学合成 DNA2

5'－CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA－3'

Ⅰ．無菌操作フード内で、爪楊枝をピンセットで掴み、寒天培地上の白色コロニーを突き、96 穴 PCR プレートの PCR 溶液へ爪楊枝先端を浸し、その後 96 穴培養プレートの大腸菌培養液に浸す。

Ⅱ．使用済みの爪楊枝を汚染物としてオートクレーブバックへ捨てる。

Ⅲ．Ⅰ、Ⅱの工程を繰り返し、10 個のコロニーをピッキングし、96 穴 PCR プレートにプレートカバーを被せる。

Ⅳ．96 穴培養プレートを 37℃にした恒温器へ移し、16～20 時間加温にて培養する。

Ⅴ．96 穴 PCR プレートを DNA 増幅装置にセットし、下記 PCR 反応サイクルにて PCR 反応を行う。

15） PCR 産物の電気泳動確認。（「4．10．1　PCR 増幅、電気泳動による確認操作」参照）

Ⅰ．PCR 反応終了後、96 穴 PCR プレートを DNA 増幅装置から回収し、氷上に置く。

Ⅱ．10ul マイクロピペットで、陰性対照サンプル、PCR 産物 10ul を新しい 96 穴 PCR プレートに分取する。

Ⅲ．電気泳動サンプルに 10ul マイクロピペットで電気泳動用添加液 2ul を加え、10ul マイクロピペットのメモリを 10ul にセットし、ピペッティング（10 回）にて混合する。

Ⅳ． 1.5%寒天で電気泳動確認する。

Ⅴ．サイズマーカーとの比較にて、500bp の PCR 産物が確認できたクローンを 2 つ記録、選択する。

※クローンの記録は 96 穴 PCR プレートの行番号（1～12）を使用し、番号を記録する。

複数クローンで 500bp の PCR 産物が確認できた場合、番号の若い順番でクローンを選択する。

16） 培養した 96 穴培養プレートを恒温器から回収し、次の操作へ進む。

※冷蔵（4℃）にて 1 週間保管可能。

4．9．1　コントロール DNA テンプレートの大量調製

ここでは、「4．9　コントロール DNA テンプレートの作成操作」にて調製した大腸菌を液体培養し、プラスミド抽出にてコントロール DNA テンプレートを調製する操作方法を簡略化して記す。

調製に使用するプラスミド抽出キットマニュアルを下記 URL から入手し、本プロトコールと併用して操作を行うこと。

プラスミド抽出キットマニュアル：「QIAprepR Miniprep プロトコールとトラブルシューティング」

「QIAprep Miniprep Handbook」

http://www.qiagen.com/products/plasmid/qiaprepminiprepsystem/qiaprepspinminiprepkit.aspx#Tabs=t2

濃度測定に関しては、後述「4．10．2　PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作」を参照する。

準備

・ 微量高速遠心機の電源を入れる。

・ 凍結保存していた抗生物質(Amp)溶液を室温に戻す。

・ 5ml ピペットで大腸菌培養液 3ml を 15ml チューブに入れ、抗生物質(Amp)溶液を 1.5ul 加え転倒混和(10 回)する。(アンピシリン終濃度:100ug/ml)

・ 恒温振とう培養器の電源を入れ、温度を 37℃にセットする。

・ プラスミド抽出キットマニュアルに従い、キット試薬の調製を行う。

注意

・ 以下、7)までは大腸菌を取り扱う操作となるため、汚染物として使用後に滅菌処理を行うこと。

1)「４．９ コントロール DNA テンプレートの作成操作」16)にて調製した 96 穴培養プレートを取り出す。

2)「４．９ コントロール DNA テンプレートの作成操作」15)にて選択した各クローン 10ul を 10ul マイクロピペットで大腸菌培養液の入った 15ml チューブに加え、植菌する。

3) 15ml チューブを 37℃にした恒温振とう培養器に移し、16～20 時間加温にて培養する。

4) 培養後、2ml マイクロチューブに大腸菌培養液 2ml を移す。

5) 2ml マイクロチューブを微量高速遠心機にて、6800g 3 分間、室温にて遠心を行う。

6) 1000ul マイクロピペットを使い、上精を除去する。

7) 1000ul マイクロピペットで Buffer P1 250ul を加え、ピペッティングにて大腸菌のペレットを再懸濁する。
※大腸菌の塊が無くなるまでピペッティングを行う。

8) 1000ul マイクロピペットで Buffer P2 250ul を加え、4～6 回ゆっくり転倒混和する。

9) 1000ul マイクロピペットで Buffer N3 350ul を加え、4～6 回転倒混和する。

10) 2ml マイクロチューブを微量高速遠心機にて、17900g 10 分間、室温にて遠心を行う。

11) 1000ul マイクロピペットで上清を QIAprep スピンカラムに全量移す。

12) QIAprep スピンカラムを微量高速遠心機にて、17900g 1 分間、室温にて遠心を行う。

13) カラム通過溶液を除く。
※デカントまたは 1000ul マイクロピペットで溶液を除く。

14) 1000ul マイクロピペットで Buffer PB 500ul を QIAprep スピンカラムに加える。

15) 12)、13)を行う。

16) 1000ul マイクロピペットで Buffer PE 750ul を QIAprep スピンカラムに加える。

17) 12)、13)を行う。

18) 12)を行う。

19) QIAprep スピンカラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、滅菌蒸留水 60ul を QIAprep スピンカラムにアプライする。
※QIAprep スピンカラムのフィルター中央にアプライする。

20) 室温で 1 分間放置する。

21) 12)を行う。

22) 1.5ml マイクロチューブから QIAprep スピンカラムを外し、100ul マイクロピペットのメモリを 45 に合わせてピペッティング(10 回)にて混合する。

23) 濃度測定を行う。
※「４．１０．２ PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作」参照。

24）　抽出したプラスミドDNAが目的のものか確認するため、PCR増幅、電気泳動確認を行う。
（「４．１０　ターゲットDNAの調製」参照）
※判定は、PCR産物が電気泳動の結果、サイズマーカーとの比較で500bpにシングルバンドとして確認されること。
もし判定にて2クローンとも不可の場合、「４．９　コントロール DNA テンプレートの作成操作」１５）にて選択したクローンを変えて1）から再度操作を行う。

25）　確認結果が良好であれば、コントロール DNA テンプレート原液として冷蔵（4℃）保存する。

26）　コントロール DNA テンプレート希釈する。
コントロール DNA テンプレートをターゲット DNA 調製時に使用する濃度に滅菌蒸留水で希釈する。
２３）にて測定した濃度から、希釈液（濃度 20pg/ul） 600ul を作成するための計算を行い、滅菌蒸留水で希釈する。
原液の濃度が濃い場合は、10倍希釈単位で段階希釈し、終濃度20pg/ulの希釈液を作成する。
希釈したコントロール DNA テンプレートは、200ul マイクロピペットにて 1.5ml マイクロチューブに 200ul ずつ分注し、冷蔵（4℃）保存する。

４．１０　ターゲットDNAの調製

ここでは、DNAチップに反応させるターゲットDNAの調製操作を記す。
海底泥から抽出したゲノム DNA 溶液から dsrB、amoA、16s rRNA 領域および蛍光標識コントロール、ハイブリコントロールを PCR 法にて増幅、精製、電気泳動による確認を行う。
※PCR増幅に関して、必ずテンプレートDNAを含まない陰性対照増幅を行うこと。

４．１０．１　PCR増幅、電気泳動による確認操作

準備

- DNA増幅装置の電源を入れる。
- 氷入れに氷を入れ、96穴プレート氷冷用アルミラックを氷上に置き冷やす。
- PCR実験に必要な試薬を氷上に置く。
- 1.5mlマイクロチューブ、96穴PCRプレートにPCR実験を行う予定のサンプル名、作成日等をマジックで記載する。

注意

- 実験操作は、ゴム手袋を着用して行うこと。
- PCR溶液作成、PCR反応後の処理操作等、全ての操作は氷上にて行うこと。

1）PCR組成（＊１２）の試薬、テンプレートDNA溶液をマイクロピペットにてdsrB、16s rRNA、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロールは96穴PCRプレート4穴分、amoAは6穴分を1.5mlマイクロチューブ1本に混合し、PCR溶液を作成する。
※分注時に発生する溶液ロスの影響を考慮し、1穴分多く作成する。

2）PCR溶液を攪拌器メモリ1にて3秒間混合する。

3）PCR溶液、遠心バランスを卓上簡易遠心機にセットし、5秒間遠心を行う。
※遠心バランスとは、作成したPCR溶液と同容量の超純水を1.5mlマイクロチューブに入れたバランス用マイクロチューブのことである。
遠心は、混合により、1.5mlマイクロチューブキャップ、壁面に付着した溶液をチューブ底に回収するために行う。

4）96穴PCRプレートに100ulマイクロピペットで100ulずつdsrB、16s rRNA、蛍光標識コントロール、ハイブリ

コントロールは 96 穴 PCR プレート 3 穴、amoA は 5 穴へ分注する。

※分注の際、泡ができないように気をつける。

5） 陰性対照サンプルとして、テンプレート DNA 溶液を含まない PCR 組成（＊12）の PCR 溶液 100ul を 100ul マイクロピペットで 96 穴 PCR プレート 1 穴にマイクロピペットにて作成する。

6） 96 穴 PCR プレートにプレートカバーを被せる。

※プレートカバーを被せる際、PCR プレートに接する面は絶対に触らないこと。

7） DNA 増幅装置に 96 穴 PCR プレートをセットし、下記 PCR 反応サイクル（＊13）にて PCR 反応を行い、ターゲット DNA、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロールの増幅を行う。

※PCR 反応サイクル終了時に DNA 増幅装置が 4℃で保持されるため、この状態で 1 晩（16～20 時間）放置することが可能。

8） PCR 反応中に PCR 増幅確認のために行う電気泳動用の 1.5%寒天を作成（＊14）する。

9） PCR 反応終了後、96 穴 PCR プレートを DNA 増幅装置から回収し、氷上に置く。

10） プレートカバーを慎重に外す。

※プレートカバーに PCR 反応後の PCR 溶液が付着している場合があり、プレートカバーを外す際に 96 穴 PCR プレート上に落としたりすると陰性対照サンプルと相互汚染が起きてしまう可能性があるので気をつけること。

11） 200ul マイクロピペットで陰性対照サンプル及びサンプル PCR 反応液をチューブ1本に回収する。

使用するマイクロチューブ

陰性対照サンプル：1.5ml マイクロチューブ

dsrB、16s rRNA、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール：2ml マイクロチューブ

amoA：15ml チューブ

12） 陰性対照サンプル、PCR 産物を攪拌器メモリ 1 にて 3 秒間混合する。

13） 陰性対照サンプル、PCR 産物、遠心バランスを卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。

14） 電気泳動用に 10ul マイクロピペットで陰性対照サンプル、PCR 産物を 10ul ずつ新しい 1.5ml マイクロチューブに分取する。

15） 陰性対照サンプル、PCR 産物を電気泳動による PCR 増幅確認操作が終了するまで冷蔵（4℃）保管する。

※冷蔵（4℃）で 1 週間保管可能。

16） 電気泳動サンプルに 10ul マイクロピペットで電気泳動用添加液 2ul を加え、攪拌器メモリ 1 で 5 秒間混合する。

17） 電気泳動サンプル、遠心バランスを卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。

18） サイズマーカー5ul、電気泳動サンプル 12ul（全量）のそれぞれを、8）で作成した 1.5%寒天の溝に 20ul マイクロピペットにて注入し、電気泳動（＊14）を行う。

19） 電気泳動終了後、DNA 染色（＊15）し、電気泳動寒天撮影装置にて写真撮影（＊16）を行う。

20） 電気泳動写真により、PCR 増幅結果判定（＊17）を行い、良好であれば精製操作へ進める。

※結果が不良であれば、1）のステップへ戻る。

＊12：PCR 組成

A. dsrB、16s rRNA 増幅用組成

	1 穴分組成	4 穴分組成	陰性対照組成
希釈ゲノム DNA 溶液（10ng/ul）	0.5 ul (5ng)	1.7 ul	-
2x KOD Buffer	50 ul	200 ul	50 ul

2mM dNTPs	20 ul	80 ul	20 ul
化学合成 DNA 1 (100uM)	0.3 ul	1.2 ul	0.3 ul
化学合成 DNA 2 (100uM)	0.3 ul	1.2 ul	0.3 ul
DNA 合成酵素(KOD)	2 ul	8 ul	2 ul
滅菌蒸留水	27 ul	108 ul	29 ul
Total volume	100 ul	400 ul	100ul

B. amoA 増幅用組成

	1 穴分組成	6 穴分組成	陰性対照組成
希釈ゲノム DNA 溶液(40ng/ul)	0.5 ul (20ng)	3 ul	-
2x KOD Buffer	50 ul	300 ul	50 ul
2mM dNTPs	20 ul	120 ul	20 ul
化学合成 DNA 1 (10uM)	0.3 ul	1.8 ul	3 ul
化学合成 DNA 2 (10uM)	0.3 ul	1.8 ul	3 ul
DNA 合成酵素(KOD)	2 ul	12 ul	2 ul
滅菌蒸留水	27 ul	162 ul	29 ul
Total volume	100 ul	600 ul	100ul

C. 蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール増幅用組成

	1 穴分組成	4 穴分組成	陰性対照組成
コントロール DNA 溶液(20pg/ul)	0.5 ul (10pg)	1.7 ul	-
2x KOD Buffer	50 ul	200 ul	50 ul
2mM dNTPs	20 ul	80 ul	20 ul
化学合成 DNA 1 (100uM)	0.3 ul	1.2 ul	0.3 ul
化学合成 DNA 2 (100uM)	0.3 ul	1.2 ul	0.3 ul
DNA 合成酵素(KOD)	2 ul	8 ul	2 ul
滅菌蒸留水	27 ul	108 ul	29 ul
Total volume	100 ul	400 ul	100ul

D. 化学合成 DNA 配列

dsrB

化学合成 DNA 1

5'－ CAACATCGTYCAYACCCAGGG －3'

化学合成 DNA 2

5'－ TTCTCGTGTTCCGTTTGTACTCTAAGGTGGAGTGTAGCAGTTACCGCA －3'

16s rRNA

化学合成 DNA 1

5'－ GCCCTACGGGAGGCAGCAG －3'

化学合成 DNA 2

5'－ TTCTCGTGTTCCGTTTGTACTCTAAGGTGGACCGTCAATTCCTTTRAGTTT －3'

amoA

化学合成 DNA 1

5'－TTCTTCTTTGTTGCCCAGTA －3'

化学合成 DNA 2

5'－TTCTCGTGTTCCGTTTGTACTCTAAGGTGGACTGAYTGGGCYTGGACAT －3'

蛍光標識コントロール

化学合成 DNA 1

5'－TACGTGTCAGTAGCATGATCGTC －3'

化学合成 DNA 2

5'－CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA －3'

ハイブリコントロール

化学合成 DNA 1

5'－ACGTGTGCACTAGCTCTACTAGG －3'

化学合成 DNA 2

5'－CGATGGCCCACTACGTGAACCATCA －3'

＊13：PCR 反応サイクル

16s rRNA

94℃ 2 分

98℃ 10 秒	
58℃ 30 秒	x 30 サイクル
68℃ 1 分	

4℃

dsrB 、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール

94℃ 2 分

98℃ 10 秒	
58℃ 30 秒	x 33 サイクル
68℃ 1 分	

4℃

amoA

94℃ 2 分

98℃ 10 秒	
58℃ 30 秒	x 37 サイクル
68℃ 1 分	

4℃

＊14：1.5%寒天の作成、電気泳動

寒天の作成、電気泳動に関しては、電気泳動装置（「4．4 機器」参照）の取扱説明書（＊18）に従い行うこと。また、基本操作に関しては、実験入門書（「4．1 はじめに」参照）を熟読しておくと良い。

ポイント

1） 1.5%寒天は、電気泳動溶液（「4．2 購入試薬」参照）で作成すること。

2） 電気泳動用寒天末の溶解に関しては、電子レンジを使用し、必ず耐熱手袋を着用して操作を行うこと。

3） 電気泳動は、135V を選択し、電気泳動装置のタイマー機能を使用して 30 分程度行うこと。

※電気泳動溶液の量、温度により電気泳動時間に対する泳動距離が異なる。

故に、電気泳動は、サイズマーカーに含まれる色素が寒天溝から 3.5cm の距離に到達するまで行うこと。

＊15：DNA 染色

DNA 染色液は発癌物質であるため、DNA 染色操作は必ずゴム手袋を着用して行い、ゴム手袋に付着した DNA 染色液等を 2 次汚染させないように十分気をつけて行うこと。

DNA 染色操作

1） DNA 染色容器に超純水 400ml を入れる。
2） DNA 染色容器に 20ul マイクロピペットで DNA 染色液 20ul を加える。
3） DNA 染色容器を蓋で密閉し、DNA 染色容器を手で持って静かに水平回転させて混合する。
   ※蓋に溶液が付着しない様、ゆっくり回転させる。
   DNA 染色液は、室温で 1 ヶ月間保存可能。
4） DNA 染色容器の蓋を外し、1.5%寒天を電気泳動装置から手で取り出し、静かに DNA 染色液に浸す。
   ※1.5%寒天は表面が滑り易いので、落とさないように注意する。
5） DNA 染色容器を蓋で密閉し、室温で 20 分間放置し、DNA 染色を行う。
6） 1000ml プラスチック体積計で超純水 500ml を計量し、新しい染色容器に入れる。
   ※不要な染色部分の脱色のため。
7） 染色後の 1.5%寒天を手で DNA 染色容器から取り出し、脱色用の超純水に浸す。
8） 室温で 15 分間放置し、脱色を行う。
9） 電気泳動寒天撮影装置にて写真撮影（＊16）を行う。

※DNA 染色液、脱色後の超純水は、必ず DNA 染色液処理システムへ廃液すること。

＊16：写真撮影

写真撮影に関しては、電気泳動寒天撮影装置に添付される取扱説明書（＊19）に従って行うこと。

ポイント

1） 1.5%寒天に付着している DNA 染色液の汚染に気をつけること。
2） 本体の光源装置部分にはラップを敷いて撮影を行い、機器に直接 1.5%寒天を接触させないこと。

＊17：PCR 増幅結果判定

1） 電気泳動の結果、各 PCR 産物のサイズがサイズマーカーとの比較で特定の位置に確認されること。
   正しく増幅された PCR 産物サイズ
   dsrB： 400bp
   amoA： 270bp
   16s rRNA： 600bp
   蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール：500bp
2） 電気泳動の結果、PCR 産物が 1 本のバンドとして確認されること。
   ※複数バンドが確認された場合は不可であるが、バックグラウンドのスメアバンドは可。

＊18：電気泳動装置の取扱説明書は、機器購入時に同封されているものを使用する。

メーカーURL：http://www.mupid.com/

＊19：電気泳動寒天撮影装置の取扱説明書は、機器購入時に同封されているものを使用する。

メーカーURL：http://www.funakoshi.co.jp/

４．１０．２ PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作

はじめに

ここでは、PCR 産物精製キットマニュアルをベースに改変した操作方法を簡略化して記す。

精製操作は、下記 URL から PCR 産物精製キットマニュアルを入手し、本プロトコールと併用して行うこと。

PCR 産物精製キットマニュアル：「QIAquickR Spin プロトコールとトラブルシューティング」「QIAquick Spin Handbook」

http://www.qiagen.com/products/dnacleanup/gelpcrsicleanupsystems/qiaquickpcrpurificationkit.aspx#Tabs=t2

準備

- 微量高速遠心機の電源を入れる。
- 氷入れに氷を入れ、1.5ml マイクロチューブ用アルミラックを氷上に置き冷やす。
- 「４．１０．１ PCR 増幅、電気泳動による確認操作」で保管していた陰性対照サンプル、PCR 産物を冷蔵庫（4℃）から取り出し、1.5ml マイクロチューブ氷冷用アルミラックに置く。
- QIAquick スピンカラムを PCR 産物精製キットから取り出し、サンプル名をマジックで記載する。
- PCR 産物の精製操作に使用するチューブ（1.5ml マイクロチューブ、15ml チューブ）にサンプル名、調製日等をマジックで記載する。

  精製操作に必要なチューブ本数

  dsrB、16s rRNA の精製：1.5ml マイクロチューブ 2 本

  amoA の精製：15ml チューブ 1 本、1.5ml マイクロチューブ 2 本
- DNA 濃度測定装置の電源（制御パソコン）を入れ、ソフトウェアを立ち上げる。

  DNA 濃度測定装置の取り扱い、濃度測定方法は、下記 URL よりメーカーのユーザーマニュアルを入手して行うこと。

  ユーザーマニュアル

  http://www.lms.co.jp/commodity/img/si/nd/ND-1000ver37.pdf
- PCR精製産物の確認のため行う電気泳動用に1.5%寒天を作成（「４．１０．１ PCR増幅、電気泳動による確認操作」参照）する。

1）「４．１０．１ PCR 増幅、電気泳動による確認操作」にて 1 本のチューブに回収した PCR 産物を、攪拌器メモリ 1 にて 3 秒間混合する。

2）Buffer PB を PCR 産物の 5 倍容量加え、攪拌器メモリ 1 にて 5 秒間混合する。

dsrB、16s rRNA、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール：1500ul

amoA：2500ul

3）3M 酢酸ナトリウム溶液を、dsrB、16s rRNA、蛍光標識コントロール、ハイブリコントロールは 10ul、amoA は 20ul 加え、攪拌器メモリ 1 にて 5 秒間混合する。

4）QIAquick スピンカラムに PCR 産物混合液 650ul アプライする。

5）微量高速遠心機を用いて、17900g で 1 分間遠心を行う。

6）ろ液を捨てる。

7）PCR 産物混合液が無くなるまで、４）、５）、６）を繰り返す。

8）QIAquick スピンカラムに PBuffre PE 750ul をアプライする。

9）５）、６）を行う。

10）QIAquick スピンカラムを溶液が入っていない状態で、再度５）の遠心を行う。

11）QIAquick スピンカラムを新しい 1.5mlマイクロチューブにセットし、滅菌蒸留水を 60ul アプライする。

12）室温で 3 分間放置する。

13）5)の遠心を行う。

14）QIAquick スピンカラムを 1.5mlマイクロチューブから外し、蓋を閉め精製操作終了。

15）DNA 濃度測定装置にて PCR 精製産物の濃度測定を行う。

濃度測定の結果、以下の条件に一致した場合、別途対応を行う。

A. 濃度測定結果が 125ng/ul 以下の場合、DNA 溶液濃縮装置を使ってPCR精製産物の濃縮操作（＊20）を行い、再度濃度測定を行う。

※濃縮操作後の濃度測定の結果が 125ng/ul 以下の場合は、下記 B. の処置を行う。

B. PCR 精製産物総量が 500ng 以下の場合は、「4．9．1　PCR 増幅、電気泳動による確認操作」を再度行い、PCR 精製産物を追加する。

16）15)の濃度測定結果より、PCR 産物 100ng 分を電気泳動用として、新しい 1.5ml マイクロチューブ 1 本に分取する。

※濃度測定結果によるが、100ng 分の PCR 精製産物を希釈する際には 10mM トリス−塩酸緩衝溶液を使用すること。

PCR 精製産物は滅菌蒸留水に溶解しているため、10mM トリス−塩酸緩衝溶液で pH 調整を行わないと電気泳動時に pH の影響からのサイズ位置が変化してしまうため、この調整は重要である。

17）10mM トリス−塩酸緩衝溶液を加え、電気泳動用 PCR 産物の容量を 10ul にする。

※10mMトリス−塩酸緩衝溶液で、希釈とpH 調整を行う。pH 調整がされていないと、電気泳動時に移動度が変わる可能性がある。

18）電気泳動用添加液 2ul を加え、攪拌器メモリ 1 で 5 秒間混合する。

19）PCR 産物、遠心バランスを卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。

20）サイズマーカー5ul、PCR 精製産物（分取全量）、陰性対照サンプル（分取全量）を、1.5%寒天の溝に 20ul マイクロピペットにて注入し、電気泳動を行う。

※本ステップ以降の操作に関して、「4．10．1　PCR 増幅、電気泳動による確認操作」を参照すること。

21）電気泳動終了後、DNA 染色し、電気泳動寒天撮影装置にて写真撮影を行う。

22）「4．9．3　ターゲット DNA 調製判定」へ進む。

＊20：濃縮操作は、DNA 溶液濃縮装置付属の取扱説明書に従って行うこと。以下、簡易操作方法を記す。

Ⅰ．遠心機、冷却とラップの電源を入れ 10 分間放置し、冷却トラップがを−85℃以下になるまで冷やす。

Ⅱ．「ROTOR」ボタンを押して、「COMP」を選択する。

Ⅲ．「AIR」ボタンを押して、ランプを点灯させる。

Ⅳ．「HEAT」ボタンを押して、「HIGH」を選択する。

Ⅴ．時間を 15 分にセットする。

Ⅵ．コンポジットローターの一番内側（中心軸側）にサンプルをセットする。

※サンプルセット時には、必ずバランスを準備し、対角線にセットする。

遠心機側面にバンドヒーターが入っているため、ローターの外側と内側では温度が異なる。

Ⅶ．「START」ボタンを押し、15 分間遠心濃縮を行う。

４．１０．３ ターゲットDNA 調製判定

ターゲットDNA 調製の判定は、「４．１０．２ PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作」にて得られた濃度測定結果、電気泳動写真をもって、以下 6 項目の条件を満たした場合のみ適合とする。

１） 濃度が 125ng/ul 以上であること。

２） OD 260/280 値が 1.75～1.85 の範囲内であること。

３） 収量が 1ug 以上であること。

４） 電気泳動の結果、PCR 産物サイズがサイズマーカーとの比較で問題が無いこと。

dsrB：400bp

amoA：270bp

16s rRNA：600bp

蛍光標識コントロール、ハイブリコントロール：500bp

５） 電気泳動の結果、PCR 産物が 1 本のバンドとして確認されること。
（バックグラウンドのスメアバンドは可）

４．１１ DNA チップ調製操作

ここでは、環境 DNA チップの保管状態からハイブリダイゼーション実験へ進めるための前処理操作に関して記す。

準備

- 沸騰装置の電源を入れ、温度を 350℃にセットする。
  ※設定温度に関しては、予め超純水が沸騰する設定温度を確認しておくこと。また、外気温の影響により設定温度を変える場合もあるので注意すること。
- 1000ml プラスチック体積計で超純水 800ml を計量し、1000ml ガラスビーカーに入れ沸騰装置に乗せて沸騰させる。
  ※超純水が沸騰し始めたら吹きこぼれない様に沸騰装置の設定温度を調整する。
- 氷入れに氷を入れる。
- 1000ml プラスチック体積計でエタノール 300ml を計量し、スライドガラス洗浄容器に入れ氷上に置きエタノールを氷冷する。
- 1000ml プラスチック体積計で超純水 900ml を計量し、スライドガラス洗浄容器 3 個に 300ml ずつ入れる。
- 調製を行う DNA チップをスライドガラス洗浄バケットにセットし、電気式乾燥保管容器内に置く。
  ※DNA チップは平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘んでスライドガラス洗浄バケットにセットする。

１） 計量器で無水こはく酸 4g を計量し、スライドガラス洗浄容器に入れる。

２）ゴム手袋を着用し、250ml ガラス体積計で 1－Methyl－2-pyrrolidinone 250ml を計量し、スライドガラス洗浄容器に加える。

３） 回転子（小）をスライドガラス洗浄容器に入れ、強力マグネット回転装置にセットする。

４） 強力マグネット回転装置メモリ 1000 にて回転子（小）を 5～10 分間回転させ、無水こはく酸を溶解する。

５） 無水こはく酸を溶解している間に、10ml プラスチックピペットで 1M ホウ酸ナトリウム溶液（pH 8.0） 27.5ml を計量し、50ml チューブに入れ、チューブ用試験管立てに立てておく。

６） 強力マグネット回転装置メモリ 1000 にて回転子（小）を回転させながら、無水こはく酸溶液に 50ml チューブに入れた 1M ホウ酸ナトリウム溶液（pH 8.0） 27.5ml をデカントで流し込み 1 分間混合を行い、回転を止める。

7） DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バケットを電気式乾燥保管容器から取り出し、静かに DNA チップ表面処理液に浸し、強力マグネット回転装置のメモリを 500 にセットして室温で 15～30 分間回転子を回転させる。

※ハイブリダイゼーション時、ガラス表面に非特異的な DNA 結合が起こらないように DNA チップ表面をマスキングする処理。

スライドガラス洗浄バケットの移動や溶液への浸沈は、スライドガラス洗浄バケットの取っ手部分を手でしっかり持って行うこと。

8） マスキング処理が終了したら、DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを取り出し、スライドガラス洗浄バスケットに付着している DNA チップ表面処理液をペーパータオルで軽く吸い取る。

9） 超純水の入ったスライドガラス洗浄容器に DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを浸し、スライドガラス洗浄バスケットの取っ手を持って 20 回上下に動かしてすすぐ。

10） 新しい超純水の入ったスライドガラス洗浄容器に DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを浸し、スライドガラス洗浄バスケットの取っ手を持って 20 回上下に動かしてすすぐ。

11） 10)を繰り返す。

12） DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを沸騰させた超純水の入った 1000ml ガラスビーカーに浸し、3 分間加温する。

13） DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを素早く氷冷したエタノールの入ったスライドガラス洗浄バスケットに浸し、5 分間放置する。

14） DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを取り出し、スライドガラス洗浄バスケットに付着しているエタノールをペーパータオルで軽く吸い取る。

15） DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケット、遠心バランスを 96 穴プレート遠心機（＊21）にセットし、90g で 2 分間、室温で遠心を行い、DNA チップ表面のエタノールを取り除く。

※遠心バランスとは、バランスを取るために準備するスライドガラス洗浄バスケットのことである。

遠心バランスのスライドガラス洗浄バスケットには、処理する DNA チップと同数の不要なスライドガラスもセットする。

16） 96 穴プレート遠心機から取り出した DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを実験台上に置き、アルミホイルを被せて 5 分間室温放置にて乾燥させる。

17） 乾燥した DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘んでスライドガラスケースに移し入れ、電気式乾燥保管容器内に保管する。

※この状態で、1 ヶ月間保存可能。

＊21：96 穴プレート遠心機

96 穴プレート遠心機の使用方法に関しては、機器付属の取扱説明書に従って行うこと。

スライドガラス洗浄バスケットのセット方法

- 96 穴プレート遠心機のプレートバスケット底にペーパータオルを敷く。
- ペーパータオルを敷いたプレートバスケットに DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを置いて遠心する。
- バランスを取る。

  ※遠心するスライドガラス洗浄バスケット、スライドガラスと同じものを準備する。

4．12 ターゲット DNA の蛍光標識

ここでは、ターゲット DNA を Cy3（蛍光色素）または Cy5（蛍光色素）で標識する操作を記す。

DNA 蛍光標識キットマニュアルをベースに改変した操作方法を簡略化して記載しているため、下記 URL から DNA 蛍光標識キットマニュアルを入手し、本プロトコールと併用して操作を行うこと。

DNA 蛍光標識キット

http://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/KRA/EA-005.pdf

4．12．1 ターゲット DNA の蛍光標識、精製操作

はじめに

環境 DNA チップのアッセイに関して、2 種類のコントロールを使用する。（「3．プロトコールの原理」参照）

蛍光標識コントロールはターゲット DNA の蛍光標識時に混合してコントロールとし、ハイブリコントロールは単独で蛍光標識してハイブリダイゼーション時にターゲット DNA と混合してコントロールとする。

準備

- 微量高速遠心機の電源を入れる。
- ブロック恒温器の電源を入れ、85℃に温度設定する。
- 氷入れに氷を入れ、1.5ml マイクロチューブ用アルミラックを氷上に置き冷やす。
- ターゲット DNA（dsrB、amoA、16s rRNA）、蛍光標識コントロール DNA を冷蔵（4℃）庫から取り出し、氷冷したアルミラックに立てておく。
- ハイブリコントロールを蔵庫から取り出し、氷冷したアルミラックに立てておく。
- 1.5ml マイクロチューブを 3 本準備し、サンプル名、作成日等をマジックで記載する。

1） 反応容量を計算する。
  - ターゲット DNA（dsrB、amoA、16s rRNA）、蛍光標識コントロール DNA
    各 DNA 500ng 分に滅菌蒸留水を加えて 16ul になるように計算。
  - ハイブリコントロール
    DNA 2ug に滅菌蒸留水を加えて 16ul になるように計算。

2） 1.5ml マイクロチューブに1）で計算した滅菌蒸留水をマイクロピペットで入れる。

3） 1）で計算した各 DNA をマイクロピペットで入れる。

4） 2ul マイクロピペットで 10x labeling solution 2ul を加える。

5） 2ul マイクロピペットで Cy3-ULS または Cy5-ULS を 2ul 加える。

6） 20ul マイクロピペットのメモリを 15ul に設定し、マイクロピペットを用いたピペッティング（20 回）にて混合する。

7） ブロック恒温器に 1.5ml マイクロチューブをセットし、85℃で 30 分間加温する。

8） 加温中に精製カラムの準備を行う。

精製カラムの準備

Ⅰ．精製カラムのつめを折り、2ml コレクションチューブにセットする。

※精製カラム、2ml コレクションチューブは DNA 蛍光標識キットに含まれている。

Ⅱ．微量高速遠心機を用いて、20400g で 1 分間遠心を行う。

※DNA 蛍光標識キットマニュアルでは 20800g と表記されているが、微量高速遠心機によっては 20800g まで遠心力が設定できないものもあるため、20400g で遠心を行う。

Ⅲ．精製カラムを外し 2ml コレクションチューブ内の水を捨て、再度精製カラムをセットする。

Ⅳ. 精製カラムの蓋を外し、1000ul マイクロピペットで滅菌蒸留水 300ul を入れる。

Ⅴ. 精製カラムの蓋を閉め、精製カラムの準備終了。

9） 1.5ml マイクロチューブを氷冷したアルミラックに移し、5 分間冷やす。

10） 氷冷したアルミラックから 1.5ml マイクロチューブを 1.5ml マイクロチューブスタンドに移し、室温で 2 分間放置する。

11） 微量高速遠心機を用いて、20400g で 1 分間遠心を行う。

12） サンプルを 1.5ml マイクロチューブスタンドに移し、アルミホイルにて遮光して室温保存。

13） 8）で準備した精製カラムを微量高速遠心機にて、20400g で 1 分間遠心を行う。

14） 精製カラムを新しい 1.5ml マイクロチューブにセットし、蓋を外す。

※1.5ml マイクロチューブの蓋は開けたまま。

15） 12）で室温保存したサンプルを精製カラムに全量アプライし、精製カラムをの蓋を閉める。

16） 微量高速遠心機を用いて、20400g で 1 分間遠心を行う。

17） 精製カラムを外し、1.5ml マイクロチューブの蓋を閉める。

18） 20ul マイクロピペットを用いて標識後のターゲット DNA 溶液量を測定する。

19） 滅菌蒸留水をマイクロピペットで加え、全量を 23ul にする。

20） 20ul マイクロピペットのメモリを 20ul にセットし、ピペッティング（20 回）にて混合する。

21） 20ul マイクロピペットで蛍光標識 DNA 溶液 20ul を新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、氷冷したアルミラックに立て、アルミホイルにて遮光保存する。

22） 21）にて残った蛍光標識 DNA 溶液を用いて回収量、標識量測定を行う。

※19）にて全量を 23ul にし、21）にて 20ul を分取するため、計算上は 3ul の残量がある。

4. 12. 2 蛍光標識 DNA の回収量、標識量測定と計算

はじめに

蛍光標識 DNA の回収量、標識量測定は、DNA 濃度測定装置を用いて行い、測定結果から回収量、蛍光色素の取り込み率を計算する。

ここでは、DNA 濃度測定装置のユーザーマニュアルをベースに操作方法を簡略化して記載しているため、ユーザーマニュアルと本プロトコールを併用して操作を行うこと。

※ユーザーマニュアルは、「4. 10. 2 PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作 準備」を参照し、入手しておく。

準備

・ DNA 濃度測定装置の電源（制御パソコン）を入れ、ソフトウェアを立ち上げる。

1） サンプル検出部に 10ul マイクロピペットで滅菌蒸留水 3ul をアプライする。

2） ソフトウェアメニュー画面の「MicroArray」ボタンをクリックする。

3） 表示されるダイアログボックスの「OK」ボタンをクリックする。

4） サンプル検出部の滅菌蒸留水をペーパーウエスで拭き取る。

5） サンプル検出部に 2ul マイクロピペットで滅菌蒸留水 1.5ul をアプライする。

6） ソフトウェア画面の「Blank」ボタンをクリックする。

7） サンプル検出部の滅菌蒸留水をペーパーウエスで拭き取る。

8） サンプル検出部に「4. 12. 1 ターゲット DNA の蛍光標識、精製操作」、22）で調製した蛍光標識 DNA 溶液 1.5ul をアプライする。

9）ソフトウェア画面の「Measure」ボタンをクリックする。

10）サンプル検出部の蛍光標識 DNA 溶液をペーパーウエスで拭き取る。

11）画面上の測定結果を実験ノート等に記録する。

※次のステップ12）にて測定結果の印刷が可能であるが、印字が小さいこと、経年劣化で消えてしまうことから、記録を取る必要がある。

12）ソフトウェア画面の「Print Screen」ボタンをクリックし、測定結果を印刷する。

※このステップは、DNA 濃度測定装置にラベルプリンターが付いている場合に行うことができる。
印刷形式は異なるが、「Print Report」ボタンでの印刷も可。

13）DNA 濃度測定装置ユーザーマニュアルに従い、終了する。

14）測定結果から、回収量（ug）、蛍光色素取り込み率（p mol/ug）を計算し、記録する。

・ 回収量計算

下記計算式にて回収量（ug）を算出。

DNA 濃度測定値（ng/ul）×20（蛍光標識 DNA 溶液量）÷1000

・ 蛍光色素取り込み率計算

下記計算式にて蛍光色素取り込み率（p mol/ug）を算出。

蛍光色素測定値（p mol/ul）×1000÷DNA 濃度測定値（ng/ul）

４．１２．３ ターゲット DNA の蛍光標識判定

ターゲット DNA の蛍光標識判定は、「４．１２．２ 蛍光標識 DNA の回収量、標識量測定と計算」にて得られた計算結果から、以下 2 項目の条件を満たした場合に適合とする。

1） インプット DNA 量に対して回収量が 50％以上であること。

2） 蛍光色素取り込み率が 20p mol/ug 以上であること。

４．１３ ハイブリダイゼーション操作

準備

・ ハイブリカセットにシリコンゴムパッキンをセットする。

・ 氷入れに氷を入れ、1.5ml マイクロチューブ用アルミラックを氷上に置き冷やす。

・ 微量高速遠心機の電源を入れる。

※微量高速遠心機の使い方に関しては、添付されている取扱説明書に従うこと。

・ 恒温器の電源を入れ、温度を 50℃にセットする。

・ ハイブリダイゼーション保湿容器の蓋（容器内側）にペーパータオルをテープで貼り付け超純水を染込ませて蓋を閉め、50℃にセットした恒温器に入れておく。

※ペーパータオルに染込ませる超純水は、ペーパータオルから水が垂れない程度にしておく。

・ ブロック恒温器の電源を入れ、温度を 94℃にセットする。

・ ミニブロック恒温器の電源を入れ、温度を 65℃にセットする。

・ ハイブリダイゼーション溶液を 65℃のミニブロック恒温器で保温する。

※「４．３ 調製試薬」参照。

・ DNA 溶液濃縮装置の電源を入れる。

※「４．１０．２ PCR 産物の精製、濃度測定、確認操作 ＊２０」参照。

設定

・ 「HEAT」ボタンで「LOW」を選択する。

・　時間を 5 分にセットする。

上記以外は＊20と同様の設定。

1）「4．12．1　ターゲット DNA の蛍光標識、精製操作」で調製したターゲット DNA 溶液　20ul にハイブリコントロール溶液　5ul を加え、攪拌器メモリ 1 にて 3 秒間混合する。

2）卓上簡易遠心機にセットし、5 秒間遠心を行う。（
※必ずバランスを取る。

3）DNA 溶液濃縮装置にターゲット DNA 溶液をセットし、加温設定「LOW」にて 5 分間遠心濃縮を行う。

4）20ul マイクロピペットを用いて、ターゲット DNA 溶液の容量を測定し、滅菌蒸留水を加えて 20ul にする。
※測定した容量が 20ul 以上の場合、3）を繰り返す。

5）ターゲット DNA 溶液をブロック恒温器にセットし、94℃で 3 分間加温する。

6）ターゲット DNA 溶液を氷冷したアルミラックに移し、5 分間氷冷する。

7）ターゲット DNA 溶液をマイクロチューブスタンドに移し、室温で 5 分間放置する。

8）微量高速遠心機にて、20400g　1 分、室温で遠心する。

9）ターゲット DNA 溶液（20ul）に 20ul マイクロピペットで 65℃に加温したハイブリダイゼーション溶液 20ul を加え、泡立てないようにピペッティング（15 回）にて混合、ブロック恒温器にセットし、2 分間加温する。

10）加温の間に、環境 DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘んでハイブリカセットにセットする。
※切りかき側を右にセットする。

11）100ul マイクロピペットでターゲット溶液 40ul を DNA チップ上（中央部）に滴下する。
このステップからは、できるだけ手早く操作を行う。
※ピペットチップ先端が DNA チップ表面に触れないように気をつける。

12）DNA チップ左端から 2mm 程度の位置に精密ピンセット先端をあて、先曲り平型フラットピンセットでカバーガラスを掴み、精密ピンセット先端にカバーガラス左端を合わせ、静かにカバーガラスを DNA チップに被せる。
※カバーガラス被せた後は動かせない。

13）10ul マイクロピペットでハイブリカセット両端の溝に滅菌蒸留水を 10ul ずつ（合計 20ul）入れ、ネジ穴を合わせてハイブリカセットの蓋を載せ、ネジを締めてしっかり密閉する。
※ハイブリカセットの内の DNA チップは固定されず動いてしまうため、ネジを締める際やハイブリカセットを持って移動する際は慎重に行う。

14）50℃にセットした恒温器内のハイブリダイゼーション保湿容器の蓋を開け、密閉したハイブリカセットを静かに入れる。

15）ハイブリダイゼーション保湿容器の蓋を閉め、50℃にセットした恒温器で 16～20 時間加温し、ハイブリダイゼーション反応を行う。

4．14　DNA チップ洗浄操作

共通事項

・　全ての操作において、操作中に DNA チップを乾燥させないように気を付けて行うこと。

準備

・　各種プラスチックピペット、マイクロピペットで 50ml チューブに 2x SSC/0.1% SDS 溶液を 40ml 作成する。
組成：20x SSC 4ml、10% SDS 0.4ml、超純水 35.6ml
※DNA チップ 1 枚に付き、40ml 作成する。

・ 1000ml プラスチック体積計、各種プラスチックピペットで 2x SSC/0.2% SDS 溶液 300ml を 500ml プラスチックビーカーに作成してスライドガラス洗浄容器に移し、回転子(小)を入れておく。
組成:20x SSC 30ml、10% SDS 6ml、超純水 264ml
・ 1000ml プラスチック体積計、各種プラスチックピペットで 0.2x SSC/0.2% SDS 溶液 900ml を 1000ml プラスチックビーカーに作成し、300ml ずつスライドガラス洗浄容器 3 個に移し、回転子(小)を入れておく。
組成:20x SSC 9ml、10%SDS 18ml、超純水 873ml
・ 1000ml プラスチック体積計、10ml プラスチックピペットで 0.2x SSC 溶液 600ml を 1000ml プラスチックビーカーに作成し、300ml ずつスライドガラス洗浄容器 2 個に移す。
組成:20x SSC 6ml、超純水 594ml

1) 恒温器からハイブリダイゼーション保湿容器を取り出し、実験台上で蓋を開ける。
2) ハイブリダイゼーション保湿容器からハイブリカセットを取り出し、ネジを緩める。
3) ハイブリカセットの蓋を外し、DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘んで 2x SSC/0.1% SDS 溶液の入った 50ml チューブに移す。
4) DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘み、ゆっくり上下に動かして静かにカバーガラスを外す。
※上記操作でカバーガラスが外れない場合は、最大 10 分まで 2x SSC/0.1% SDS 溶液に浸して再度操作する。
5) DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘み、スライドガラス洗浄バスケットにセットし、DNA チップをセットしたスライドガラス洗浄バスケットを 2x SSC/0.2% SDS 溶液の入ったスライドガラス洗浄容器に浸し、強力マグネット回転装置メモリ 500 にて回転子を回転させ、室温で 15 分間洗浄を行う。
6) DNA チップをセットしたスライドガラス洗浄バスケットを 0.2x SSC/0.2% SDS 溶液の入ったスライドガラス洗浄容器に移し、強力マグネット回転装置メモリ 500 にて回転子を回転させ、室温で 15 分間洗浄を行う。
7) DNA チップをセットしたスライドガラス洗浄バスケットを新しい 0.2x SSC/0.2% SDS 溶液の入ったスライドガラス洗浄容器に移し、強力マグネット回転装置メモリ 500 にて回転子を回転させ、室温で 15 分間洗浄を行う。
8) 7)の操作を繰り返す。
9) DNA チップをセットしたスライドガラス洗浄バスケットを 0.2x SSC 溶液の入ったスライドガラス洗浄容器に移し、スライドガラス洗浄バスケットの取っ手を持って 20 回上下に動かしてすすぐ。
10) DNA チップをセットしたスライドガラス洗浄バスケットを新しい 0.2x SSC 溶液の入ったスライドガラス洗浄容器に移し、スライドガラス洗浄バスケットの取っ手を持って 20 回上下に動かしてすすぐ。
11) DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを取り出し、スライドガラス洗浄バスケットに付着している 0.2x SSC 溶液をペーパータオルで軽く吸い取る。
12) DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケット、遠心バランスを 96 穴プレート遠心機にセットし、90g で 2 分間、室温で遠心を行い、DNA チップ表面の 0.2x SSC 溶液を取り除く。
※「4.11 DNA チップ調製操作」参照。
13) 96 穴プレート遠心機から取り出した DNA チップのセットされたスライドガラス洗浄バスケットを実験台上に置き、アルミホイルを被せて 5 分間室温放置にて乾燥させる。
14) 乾燥した DNA チップを平型フラットピンセットで切りかき側をしっかり摘んでスライドガラスケースに移し入れ、次の操作へ進む。

４．１５ DNA チップ検出操作

はじめに

DNA チップ用検出器の使用方法に関しては、メーカーマニュアル（＊２２）に従うこと。

ここでは、メーカーマニュアルをベースに操作方法を簡略化して記載しているため、メーカーマニュアルと本プロトコールを併用して操作を行うこと。

＊２２：メーカーマニュアル

マニュアルは、DNA チップ用検出器の制御ソフトウェア「Agilent Scan Control」のヘルプまたは下記 URL から入手して使用する。

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2505-90021_ScannerC_User.pdf

注意

DNA チップの取り扱いはゴム手袋を着用し、絶対に DNA がスポットされている部分を触らないように気を付けること。

準備

・ DNA チップ用検出器制御パソコンの電源を入れ、ログインする。
・ DNA チップ用検出器の電源を入れ、ウォーミングアップ（3 分程度）する。

１） ソフトウェア「Agilent Scan Control」を起動する。
※ソフトウェアを立ち上げると、自動で DNA チップ用検出器のイニシャライズ、レーザーウォームアップを開始する。

２） スライドガラスケースから検出する DNA チップを取り出し、スライドフォルダにセットする。
※セットする方向等の注意があるため、メーカーマニュアル Figure を参照すること。

３） スライドフォルダをカローセルにセットし、カローセルにカバーを被せ、DNA チップ用検出器にセットする。
※スライドフォルダをホームスロットに入れないように気をつける。
DNA チップとスライドフォルダをセットしたカローセル位置番号の対応をメモしておく。

４） メイン画面上で必要情報を入力する。

Ⅰ. 検出するスロットの設定
カローセルにセットした DNA チップのスロット位置を Scan slot（画面左上）で設定する。

Ⅱ. サンプル名の入力
「Slot ID」カラムに DNA チップのサンプル名を入力する。
※3）の対応メモを確認して入力する。

Ⅲ. 蛍光色素情報の設定
「Channels」カラムの R（Red：Cy5）または G（Green：Cy3）で検出する DNA チップの蛍光色素を選ぶ。
※数値化解析ソフトウェア機能制限の関係で、数値化解析を行う場合は、Cy3 単色は「G」を選択、Cy5 単色は「R＋G」を選択する。

Ⅳ. 検出範囲の設定
「Scan Region」カラムで「Agilent HD (61x21.6mm)」を選択する。

Ⅴ. 解像度の設定
「Resolution」カラムで「5um」を選択する。

Ⅵ. 検出する情報量の設定
「TIFF」カラムで「20 bit」を選択する。

Ⅶ. 検出器感度の設定

「R PMT」または「G PMT」カラムで「100%」を選択する。

Ⅷ. データ保存場所の設定

「Output Path」カラムで保存したい場所（フォルダ等）を指定する。

※必ずデータハードディスク上に保存すること。

Ⅸ. その他

「XDR」カラムで「No XDR」を選択する。

5）レーザーのウォームアップが終了していること確認する。

メイン画面のステータスカラム（画面左下）に「Scanner ready」と表示されていることを確認する。

6）メイン画面の「Scan Slot m-n」（＊23）ボタン（画面右下）をクリックし、検出を開始する。

＊23：「Scan Slot m-n」ボタンの m、n には4）Ⅰで設定したスロットの番号が表示される。

検出が開始されると「Scan Progress」ダイアログが開き、ステータスが表示される。

7）検出が終了するとメッセージ画面が開くので、確認して閉じる。

8）検出時のステータスダイアログの「Close」ボタン（ダイアログ画面右下）をクリックし、ダイアログを閉じる。

9）レーザー電源を切る。

Ⅰ. メイン画面のメニューバーから「Tools」→「Laser Auto ON/OFF Setting…」を選択する。

Ⅱ. 表示されたダイアログの「Turn Laser OFF Now」ボタン（画面下）をクリックし、レーザー電源を切る。

Ⅲ. ダイアログを閉じる。

10）メイン画面のメニューバーから「File」→「Exit」を選択し、ソフトウェア「Agilent Scan Control」を終了する。

11）検出の完了。

Ⅰ. DNA チップ用検出器の電源を切る。

Ⅱ. DNA チップ用検出器制御パソコンをシャットダウンして完了。

4．16 検出画像データの数値化操作

ここでは、メーカーマニュアル（＊24）をベースに操作方法を簡略化して記載しているため、メーカーマニュアルと本プロトコールを併用して操作を行うこと。

＊24：メーカーマニュアル

マニュアルは、DNA チップ用検出器メーカーが提供しているソフトウェア「Feature Extraction」のヘルプまたは下記 URL から入手して使用する。

http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4460_90034_FeatureExtraction_User.pdf

準備

- DNA チップ用検出器制御パソコンの電源を入れ、ログインする。
- 環境 DNA チップのプローブ情報（プローブ名、プローブ位置情報）をソフトウェア「Feature Extraction」で認識可能な「gal ファイル」（＊25）を作成しておき、データハードディスク内にコピーしておく。
- 事前に DNA チップ用検出器メーカー（＊26）と相談して数値化用プロトコールを入手し、データハードディスク内にコピーしておく。

＊25：gal ファイル

プローブを特定する名称、そのプローブが DNA チップ上のどの位置にあるのか設定したファイルで、DNA チップのプローブ全体配置情報（DNA チップ提供者から入手する）から作成する。

この gal ファイルが無いと、検出画像データの数値化はできないので、必ず作成しておく。

※DNA チップ提供者からプローブ全体配置情報を入手したら、DNA チップ用検出器メーカー（＊26）に相談して作成すると良い。

＊26：DNA チップ用検出器メーカー

アジレント・テクノロジーズ株式会社

0120-477-111

1） ソフトウェア「Feature Extraction」を起動する。

2） メイン画面のメニューバーから「File」→「New」→「Standard Project」を選択する。

※新しい Project を作成する。

3） Project 画面左側の「Project Explorer」ウインドウに数値化を行う画像データをドラックする。

※ツリー状に複数ファイルが表示される。

4） Project Explorer ウインドウ内の画像（.tif）データをダブルクリックして開く。

5） メニューバーから「Edit」→「Grid Mode」を選択する。

※「Create/Edit Grid」ダイアログが開く。

6） 「Gene List Type:」項目で「Gene List」を選択、「Protocol for Grid Mode:」項目で「準備」にて保存したプロトコールを選択し、「OK」ボタンをクリックする。

※ファイル選択ダイアログが開く。

7） 「準備」で保存した gal ファイルを選択し、「開く」ボタンをクリックする。

※「Geometry Information」ダイアログが開く。

8） 「Manual Fit」ボタン（画面右側）をクリックする。

※画像画面上にグリッド画面が出る。

9） 検出画像データにグリッドを合わせる。

※グリッドの合わせ方は、メーカーマニュアルを参照すること。

10） メニューバーから「File」→「Save grid」を選択する。

※グリッド合わせを行った画像データファイル名で「・・・grid.csv」「・・・feat.csv」の 2 種類のファイルが保存される。

11） 画像画面のクローズボタン（画像画面右上の「X」ボタン）をクリックし、画像画面を閉じる。

※3）で作成した Project 画面に戻る。

12） Project 画面「Extraction Set Configuration」ウインドウにて、「Grid Name」項目で「Browse Grid File」を選択する。

※ファイル選択ダイアログが開く。

13） 10）で保存したグリッドファイル（「・・・grid.csv」を選択する。

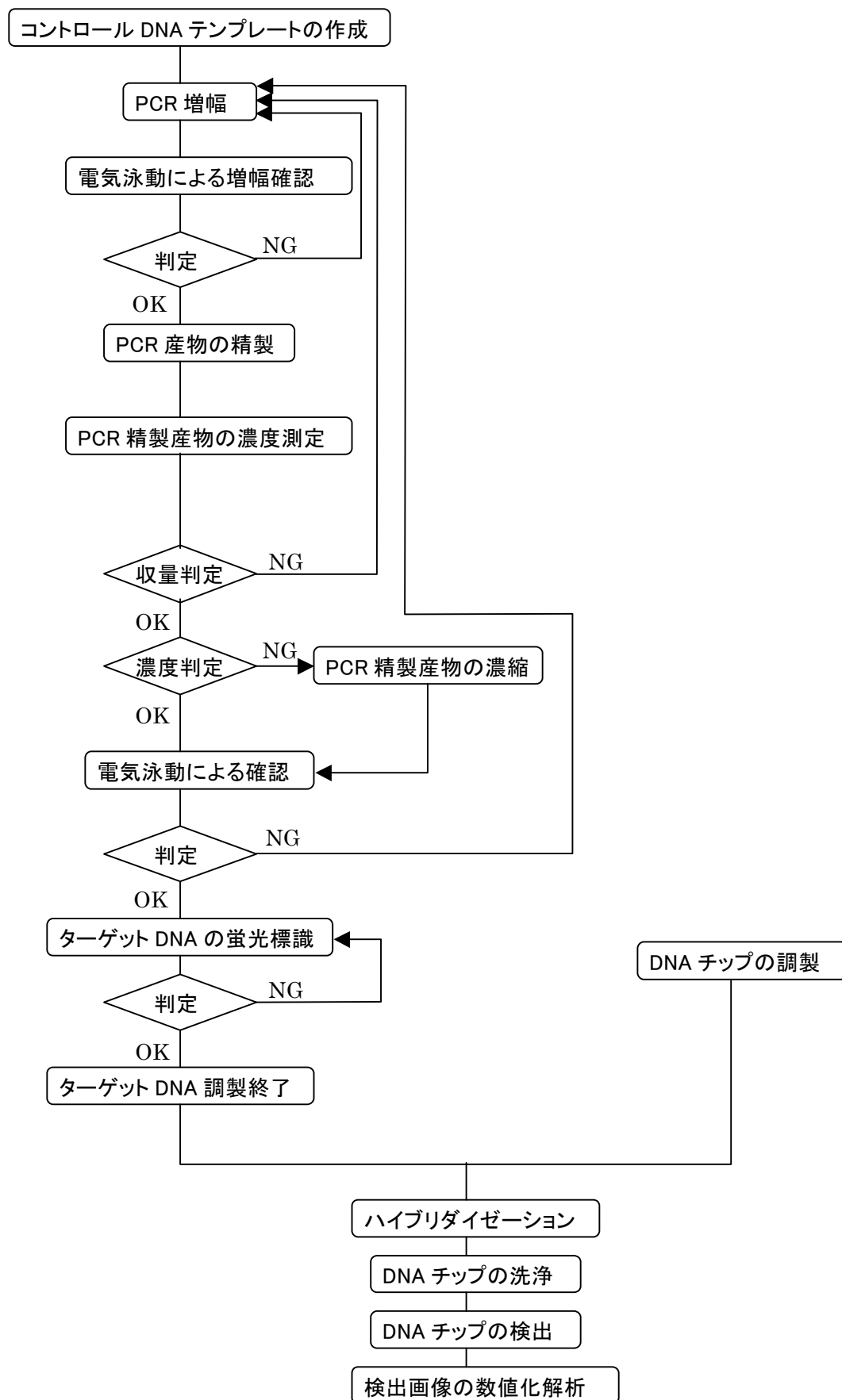
14） Project 画面「Extraction Set Configuration」ウインドウにて、「Protocol Name」項目で「準備」にて保存したプロトコールを選択する。

15） Project 画面メニューバーから「Project」→「Start Extracting」を選択し、数値化解析を開始する。

※"Project を保存しますか？"とダイアログが出るので、ファイル名をわかり易いものに変えて保存する。（保存しないと数値化解析が開始しない）

16） 数値化解析が終了すると、「Summary Report」のタブが開き、情報表示され終了する。

※数値化データは、タブ区切りテキストファイルとして保存される。

4．17　実験操作フロー図

5．トラブルシューティング

原則として、同操作を 2 回行って同様に発生するトラブルに関しては、下記のトラブルシューティングを参照する。（ハンドリングミス以外の可能性がある）

尚、DNA チップ検出結果でバックグラウンドトラブルの大半はハイブリダイゼーション、操作中に DNA チップが乾燥してしまったことに起因している。

・PCR 関連

Q1．「PCR 増幅ができない」「複数バンドが検出された」「陰性対照にバンドが検出された」
A1．PCR 試薬一式（滅菌蒸留水、Buffer、dNTP、酵素、化学合成 DNA）のロットを新しくする。
A2．希釈ゲノム DNA 溶液のロットを新しくする。

Q2．PCR 産物が精製により無くなってしまう。
A1．精製キット付属マニュアルのトラブルシューティングを参照、またはキットメーカーに問い合わせる。
A2．精製キット、滅菌蒸留水のロット新しくする。

Q3．精製 PCR 産物の収量が少ない。
A1．精製キット付属マニュアルのトラブルシューティングを参照、またはキットメーカーに問い合わせる。
A2．PCR 増幅するサンプル数を増やし、精製サンプル数を増やす。

・蛍光標識関連

Q1．蛍光標識後、ターゲット DNA の回収量が少ない。
A1．蛍光標識操作時にインプットするターゲット DNA 量を確認する。（再度濃度測定を行う等）

Q2．蛍光色素取り込み率が悪い。
A1．精製キット付属マニュアルのトラブルシューティングを参照、またはキットメーカーに問い合わせる。
A2．DNA 蛍光標識キットのロットを新しくする。

・ハイブリダイゼーション関連

Q1．ハイブリダイゼーション操作時のカバーガラスを被せる際にずれてしまう。
A1．一般のスライドガラス、カバーガラスを使い練習する。

Q2．DNA チップ検出結果にて、バックグラウンドが高い。
A1．DNA チップ調製操作や DNA チップ洗浄操作中に DNA チップを乾燥させない。
A2．ハイブリダイゼーション時の保湿を確実にする。
　1）ハイブリカセットのパッキンを新しいものと交換する。（ゴムパッキンの劣化）
　2）ハイブリカセットを新しいものと交換する。（ハイブリカセット蓋の劣化）

Q3．DNA チップ検出結果にて、シグナル強度が低すぎる。
A1．ターゲット DNA 調製を最初からやり直す。（ターゲット DNA 調製トラブル）
A2．DNA チップのロットを新しくする。（DNA チップの劣化）

６．是正処置

実験操作内容改善、プロトコールの不明箇所改善、手法改善等に役立てるため、マニュアル使用者から「ご意見依頼票（別紙 001）」を定期的に回収し、是正処置を行うシステムとする。

マニュアル作成者が是正処置を行った場合、審査、承認を経て本プロトコールの「変更改訂履歴」へ内容を記載し、マニュアル使用者へ報告する。

別紙 001

ご意見依頼票　第2版

承認	審査	作成

ご記入日	

フリガナ	
ご氏名	
ご所属	
ご住所	〒
電話	
E-mail	

プロトコール不明箇所	
改善提案	
トラブル、苦情等	

別紙 002

採泥記録簿　第2版

承認	審査	作成

採泥記録簿番号	

1．採泥記録

サンプル番号	採泥担当組織	採泥地域	採泥場所	採泥日	採泥測点

採泥器具	採泥日天候	採泥前日天候	気温 （℃）	水深 （m）	底層水温 （℃）

底層溶存酸素 （mg/L）	採泥総量 （g）	酸揮発性硫化物質 （mg/g ・ dry）	強熱減量 （%）	化学的酸素要求量 （mg ・ l）	有機体炭素量 （mg/g）

総窒素量 （mg/g ・ dry）	総リン量 （mg/g）	内湾度指数	ベントス湿重量	ベントス個体数	ベントス種類数

備考

別紙 003

DNA チップ作成記録簿　第1版

承認	審査	作成

DNA チップ作成記録簿番号	

1．DNA チップ作成記録

DNA チップ作成担当組織	DNA チップ作成担当者	DNA チップ作成記録簿番号	DNA チップ作成日

DNA チップ作成装置番号	DNA チップ作成枚数	DNA チッププロット番号	プローブロット番号	スポット溶液

DNA チップ配置表番号	DNA チップ固定操作日

備考

別紙 004

DNA 抽出記録簿　第2版

承認	審査	作成

DNA 抽出記録簿番号	

1. 海底泥からの DNA 抽出記録

サンプル番号	DNA 抽出担当組織	DNA 抽出担当者	採泥記録簿番号	DNA 抽出用海底泥量(g)

DNA 抽出方法	DNA 抽出日	抽出 DNA ラベル名	DNA 溶媒	DNA 濃度(ug/ul)

DNA 総量(ug)	OD 260/280 値

1.　抽出 DNA の状態記録

目視による DNA 溶液の状態(着色等)	
電気泳動写真	
備考	

別紙 005

送付記録簿　第2版

承認	審査	作成

送付記録簿番号	

1. 送付内容

送付物種類	送付物総数
☐ 海底泥　☐ DNA チップ　☐ DNA 溶液 ☐ その他（　　　　　）	

2. 送付サンプル関連記録簿

採泥記録簿番号	DNA チップ作成記録簿	DNA 抽出記録簿番号

サンプル番号	送付サンプル内容（容量、濃度など）	梱包容器	送付温度	送付数
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	

1.　送付情報

送付担当組織		
送付担当者		
送付先情報	氏名	
	住所	〒
	電話	
	E-mail	
備考		

別紙 006

受領記録簿 第1版

承認	審査	作成

受領記録簿番号	

1. 受領内容

受領物種類	送付物総数
☐ 海底泥　☐ DNA チップ　☐ DNA 溶液 ☐ その他（　　）	

受領日	受領担当者	受領物保管担当者	受領物保管先

サンプル番号	送付サンプル内容（容量、濃度など）	梱包容器	送付温度	送付数
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	
			☐ 冷蔵 ☐ 冷凍 ☐ 室温	

2. 送付先情報

送付担当組織	
送付担当者	
備考	